

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
9. September 2005 (09.09.2005)

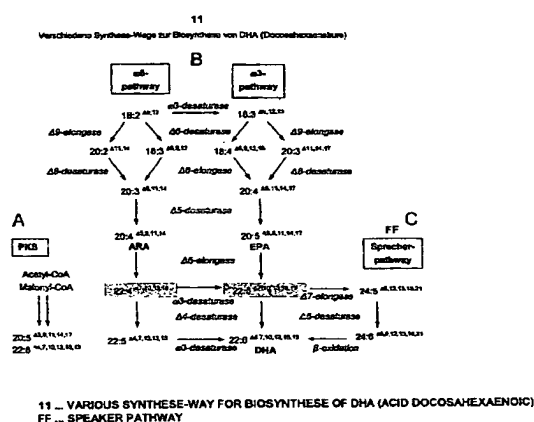
PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2005/083093 A2

(51) Internationale Patentklassifikation <sup>7</sup> :	C12N 15/82	10 2004 012 370.5	13. März 2004 (13.03.2004)	DE
(21) Internationales Aktenzeichen:	PCT/EP2005/001863	10 2004 017 518.7	8. April 2004 (08.04.2004)	DE
(22) Internationales Anmeldedatum:	23. Februar 2005 (23.02.2005)	10 2004 024 014.0	14. Mai 2004 (14.05.2004)	DE
		PCT/EP/04/07957	16. Juli 2004 (16.07.2004)	EP
		10 2004 062 543.3	24. Dezember 2004 (24.12.2004)	DE
(25) Einreichungssprache:	Deutsch	(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US):	BASF PLANT SCIENCE GmbH [DE/DE]; 67056 Ludwigshafen (DE).	
(26) Veröffentlichungssprache:	Deutsch	(72) Erfinder; und		
(30) Angaben zur Priorität:	10 2004 009 457.8	(75) Erfinder/Anmelder (nur für US):	CIRPUS, Petra	
	27. Februar 2004 (27.02.2004)		[Fortsetzung auf der nächsten Seite]	

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN TRANSGENIC PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG MEHRFACH UNGESÄTTIGTER FETTSÄUREN IN TRANSGENEN PFLANZEN



(57) Abstract: The invention relates to a method for producing polyunsaturated fatty acids in seeds of transgenic plants. According to said method, nucleic acids, coding for polypeptides with a  $\omega$ -3-desaturase,  $\Delta$ -12-desaturase,  $\Delta$ -6-desaturase,  $\Delta$ -6-elongase,  $\Delta$ -5-desaturase,  $\Delta$ -5-elongase and/or  $\Delta$ -4-desaturase activity, preferably for polypeptides with a  $\Delta$ -6-desaturase,  $\Delta$ -6-elongase and  $\Delta$ -5-desaturase activity, are introduced into the organism. The nucleic acid sequences are represented by SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 and SEQ ID NO: 201. Advantageously, said nucleic acid sequences can be expressed in the organism optionally together with other nucleic acid sequences that code for polypeptides of the biosynthesis of the fatty acid or lipid metabolism. Nucleic acid sequences coding for a  $\Delta$ -6-desaturase,  $\Delta$ -5-desaturase,  $\Delta$ -4-desaturase,  $\Delta$ -12-desaturase and/or  $\Delta$ -6-elongase activity are especially advantageous. Advantageously, said desaturases and elongases originate from thalassiosira, euglena or ostreococcus. The invention

also relates to a method for producing oils and/or triacylglycerides with an increased content of long-chain polyunsaturated fatty acids. In a preferred embodiment, the invention also relates to a method for producing arachidonic acid, eicosapentaenoic acid or docosahexaenoic acid, and to a method for producing triglycerides with an increased content of unsaturated fatty acids, especially arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and/or docosahexaenoic acid, in transgenic plants, preferably in seeds of the transgenic plants. The invention further relates to the production of a transgenic plant with an increased content of polyunsaturated fatty acids, especially arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and/or docosahexaenoic acid, based on the expression of the elongases and desaturases used in the inventive method. The invention also relates to recombinant nucleic acids molecules containing, together or individually, nucleic acid sequences coding for the polypeptides with a  $\Delta$ -6-desaturase,  $\Delta$ -6-elongase,  $\Delta$ -5-desaturase and  $\Delta$ -5-elongase activity, and transgenic plants containing said recombinant nucleic acid molecules. Another part of the invention relates to oils, lipids and/or fatty acids produced according to the inventive method, and to the use thereof. Furthermore, the invention relates to unsaturated fatty acids and triglycerides with an increased content of unsaturated fatty acids, and to the use of the same.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Samen transgener Pflanzen, indem Nukleinsäuren in den Organismus eingebracht werden, die für Polypeptide mit  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- und/oder  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität bevorzugt für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturase-,

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/083093 A2

BEST AVAILABLE COPY



[DE/DE]; Landteilst. 12, 68163 Mannheim (DE). **BAUER, Jörg** [DE/DE]; Thorwaldsenstr. 1A, 67061 Ludwigshafen (DE). **QIU, Xiao** [CA/CA]; 403 Kendarline Road, Saskatoon Sk. S7N 3S5 (CA). **WU, Guohai** [CA/CA]; 2103 Kendarline Road, Saskatoon Sk. S7N 4A9 (CA). **DATLA, Nagamani** [CA/CA]; 527 Bayview Terrace, Saskatoon Sk. S7V 1B6 (CA).

(74) **Anwalt:** PRESSLER, Uwe; c/o BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ,

TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

$\Delta$ -6-Elongase- und  $\Delta$ -5-Desaturaseaktivität codieren. Bei den Nukleinsäuresequenzen handelt es sich um die in SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 und SEQ ID NO: 201 dargestellten Sequenzen. Vorteilhaft können diese Nukleinsäuresequenzen gegebenenfalls zusammen mit weiteren Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide der Biosynthese des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels codieren, in dem Organismus exprimiert werden. Besonders vorteilhaft sind Nukleinsäuresequenzen, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase-, eine  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -1 2-Desaturase- und/oder  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität codieren. Vorteilhaft stammen diese Desaturasen und Elongasen aus *Thalassiosira*, *Euglena* oder *Ostreococcus*. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triacylglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Die Erfindung betrifft in einer bevorzugten Ausführungsform ausserdem ein Verfahren zur Herstellung von Arachidonsäure, Eicosapentaensäure oder Docosahexaensäure sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure, in transgenen Pflanzen vorteilhaft im Samen der transgenen Pflanze. Die Erfindung betrifft die Herstellung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure, aufgrund der Expression der im erfindungsgemässen Verfahren verwendeten Elongasen und Desaturasen. Die Erfindung betrifft weiterhin rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die die Nukleinsäuresequenzen, die für die Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase- und  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität kodieren, gemeinsam oder einzeln enthalten, sowie transgene Pflanzen, die die vorgenannten rekombinanten Nukleinsäuremoleküle enthalten. Ein weiterer Teil der Erfindung betrifft Öle, Lipide und/oder Fettsäuren hergestellt nach dem erfindungsgemässen Verfahren und deren Verwendung. Ausserdem betrifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

## Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren in transgenen Pflanzen

### Beschreibung

- Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren im Samen transgener Pflanzen, indem Nukleinsäuren in den Organismus eingebracht werden, die für Polypeptide mit  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- und/oder  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität bevorzugt für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase- und  $\Delta$ -5-Desaturaseaktivität codieren.
- 5 Bei den Nukleinsäuresequenzen handelt es sich um die in SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 und SEQ ID NO: 201 dargestellten Sequenzen. Bevorzugt wird neben diesen Nukleinsäuresequenzen eine weitere Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit einer  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität kodiert, in die Pflanze eingebracht und ebenfalls gleichzeitig exprimiert. Besonders
- 15 bevorzugt handelt es sich dabei um die in SEQ ID NO: 195 dargestellte Nukleinsäuresequenz.
- Vorteilhaft können diese Nukleinsäuresequenzen gegebenenfalls zusammen mit weiteren Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide der Biosynthese des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels codieren, in dem Organismus exprimiert werden. Besonders
- 20 vorteilhaft sind Nukleinsäuresequenzen, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase-, eine  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase- und/oder  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität codieren. Vorteilhaft stammen diese Desaturasen und Elongasen aus *Thalassiosira*, *Euglena* oder *Ostreococcus*. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triacylglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an langkettigen
- 25 mehrfach ungesättigten Fettsäuren.
- Die Erfindung betrifft in einer bevorzugten Ausführungsform außerdem ein Verfahren zur Herstellung von Arachidonsäure, Eicosapentaensäure oder Docosahexaensäure sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure, Eicosapentaensäure
- 30 und/oder Docosahexaensäure, in transgenen Pflanzen vorteilhaft im Samen der transgenen Pflanze. Die Erfindung betrifft die Herstellung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure, aufgrund der Expression der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Elongasen und Desaturasen.
- 35 Die Erfindung betrifft weiterhin rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die die Nukleinsäuresequenzen, die für die Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase- und  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität kodieren, gemeinsam oder einzeln enthalten, sowie transgene Pflanzen, die die vorgenannten rekombinanten Nukleinsäuremoleküle enthalten.

Ein weiterer Teil der Erfindung betrifft Öle, Lipide und/oder Fettsäuren hergestellt nach dem erfindungsgemäßen Verfahren und deren Verwendung. Außerdem betrifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

- 5 Die Lipidsynthese lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die Synthese von Fettsäuren und ihre Bindung an sn-Glycerin-3-Phosphat sowie die Addition oder Modifikation einer polaren Kopfgruppe. Übliche Lipide, die in Membranen verwendet werden, umfassen Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Phosphoglyceride. Die Fettsäuresynthese beginnt mit der Umwandlung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA durch  
10 die Acetyl-CoA-Carboxylase oder in Acetyl-ACP durch die Acetyltransacylase. Nach einer Kondensationsreaktion bilden diese beiden Produktmoleküle zusammen Acetoacetyl-ACP, das über eine Reihe von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratisierungsreaktionen umgewandelt wird, so dass ein gesättigtes Fettsäuremolekül mit der gewünschten Kettenlänge erhalten wird. Die Produktion der ungesättigten Fettsäuren  
15 aus diesen Molekülen wird durch spezifische Desaturasen katalysiert, und zwar entweder aerob mittels molekularem Sauerstoff oder anaerob (bezüglich der Fettsäuresynthese in Mikroorganismen siehe F.C. Neidhardt et al. (1996) E. coli und Salmonella. ASM Press: Washington, D.C., S. 612-636 und darin enthaltene Literaturstellen; Lengeler et al. (Hrsgb.) (1999) Biology of Prokaryotes. Thieme: Stuttgart, New  
20 York, und die enthaltene Literaturstellen, sowie Magnuson, K., et al. (1993) Microbiological Reviews 57:522-542 und die enthaltenen Literaturstellen). Die so hergestellten an Phospholipide gebundenen Fettsäuren müssen anschließend für die weiteren Elongationen aus den Phospholipiden wieder in den FettsäureCoA-Ester-Pool überführt werden. Dies ermöglichen Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen. Weiterhin  
25 können diese Enzyme die elongierten Fettsäuren wieder von den CoA-Estern auf die Phospholipide übertragen. Diese Reaktionsabfolge kann gegebenenfalls mehrfach durchlaufen werden.

- Ferner müssen Fettsäuren anschließend an verschiedene Modifikationsorte transportiert und in das Triacylglycerin-Speicherlipid eingebaut werden. Ein weiterer wichtiger  
30 Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren auf die polaren Kopfgruppen, beispielsweise durch Glycerin-Fettsäure-Acyltransferase (siehe Frentzen, 1998, Lipid, 100(4-5):161-166).

- Veröffentlichungen über die Pflanzen-Fettsäurebiosynthese, Desaturierung, den Lipidstoffwechsel und Membrantransport von fetthaltigen Verbindungen, die Betaoxidation, Fettsäuremodifikation und Cofaktoren, Triacylglycerin-Speicherung und -  
35 Assemblierung einschließlich der Literaturstellen darin siehe in den folgenden Artikeln: Kinney, 1997, Genetic Engineering, Hrsgb.: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge und Browse, 1995, Plant Cell 7:957-970; Shanklin und Cahoon, 1998, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:611-641; Voelker, 1996, Genetic Engineering, Hrsgb.: JK  
40 Setlow, 18:111-13; Gerhardt, 1992, Prog. Lipid R. 31:397-417; Gühnemann-Schäfer & Kindl, 1995, Biochim. Biophys Acta 1256:181-186; Kunau et al., 1995, Prog. Lipid Res. 34:267-342; Stymne et al., 1993, in: Biochemistry and Molecular Biology of Membrane



and Storage Lipids of Plants, Hrsgb.: Murata und Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, Plant Journal. 13(1):1-16.

5 Im folgenden werden mehrfach ungesättigte Fettsäuren als PUFA, PUFAs, LCPUFA oder LCPUFAs bezeichnet (poly unsaturated fatty acids, PUFA, mehrfach ungesättigte Fettsäuren; long chain poly unsaturated fatty acids, LCPUFA, langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren).

10 Fettsäuren und Triacylglyceride haben eine Vielzahl von Anwendungen in der Lebensmittelindustrie, der Tierernährung, der Kosmetik und im Pharmabereich. Je nachdem, ob es sich um freie gesättigte und ungesättigte Fettsäuren oder um Triacylglyceride mit einem erhöhten Gehalt an gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren handelt, sind sie für die unterschiedlichsten Anwendungen geeignet. Mehrfach-  
15 ungesättigte Fettsäuren wie Linol- und Linolensäure sind für Säugetiere essentiell, da sie nicht von diesen selbst hergestellt werden können. Deshalb stellen mehrfach ungesättigte  $\omega$ -3-Fettsäuren und  $\omega$ -6-Fettsäuren einen wichtigen Bestandteil der tierischen und menschlichen Nahrung dar. So werden z.B. in der humanen Ernährung Lipide mit ungesättigten Fettsäuren, speziell mehrfach ungesättigten, Fettsäuren bevorzugt. Den mehrfach ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren wird dabei ein positiver Effekt  
20 auf den Cholesterinspiegel im Blut und damit auf die Prävention einer Herzerkrankung zugeschrieben. Durch Zugabe dieser  $\omega$ -3-Fettsäuren zur Nahrung kann das Risiko einer Herzerkrankung, eines Schlaganfalls oder von Bluthochdruck deutlich verringert werden (Shimikawa 2001, World Rev. Nutr. Diet. 88, 100-108).

25 Auch entzündliche, speziell chronisch entzündliche, Prozesse im Rahmen immunologischer Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis lassen sich durch  $\omega$ -3-Fettsäuren positiv beeinflussen (Calder 2002, Proc. Nutr. Soc. 61, 345-358; Cleland und James 2000, J. Rheumatol. 27, 2305-2307). Sie werden deshalb Lebensmitteln, speziell diätetischen Lebensmitteln, zugegeben oder finden in Medikamenten Anwendung.  $\omega$ -6-Fettsäuren wie Arachidonsäure üben bei diesen rheumatischen Erkrankungen eher einen negativen Effekt aus.

30  $\omega$ -3- und  $\omega$ -6-Fettsäuren sind Vorläufer von Gewebshormonen, den sogenannten Eicosanoiden wie den Prostaglandinen, die sich von der Dihomo- $\gamma$ -linolensäure, der Arachidonsäure und der Eicosapentaensäure ableiten, und den Thromboxanen und Leukotrienen, die sich von der Arachidonsäure und der Eicosapentaensäure ableiten. Eicosanoide (sog.  $PG_2$ -Serie), die aus  $\omega$ -6-Fettsäuren gebildet werden,  
35 fördern in der Regel Entzündungsreaktionen, während Eicosanoide (sog.  $PG_3$ -Serie) aus  $\omega$ -3-Fettsäuren geringe oder keine entzündungsfördernde Wirkung haben.

40 Mehrfach ungesättigte langkettige  $\omega$ -3-Fettsäuren wie Eicosapentaensäure (= EPA,  $C_{20}:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$ ) oder Docosahexaensäure (= DHA,  $C_{22}:6^{\Delta 4,7,10,13,16,19}$ ) sind wichtige Komponenten der menschlichen Ernährung aufgrund ihrer verschiedenen Rollen in der Gesundheit, die Aspekte wie die Entwicklung des kindlichen Gehirns, der Funktionalität des Auges, der Synthese von Hormonen und anderer Signalstoffe, sowie die Vorbeu-

gung von Herz-Kreislauf-Beschwerden, Krebs und Diabetes umfassen (Poulos, A Lipids 30:1-14, 1995; Horrocks, LA und Yeo YK Pharmacol Res 40:211-225, 1999). Es besteht aus diesem Grund ein Bedarf an der Produktion mehrfach ungesättigter langkettiger Fettsäuren.

- 5 Aufgrund der heute üblichen Zusammensetzung der menschlichen Nahrung ist ein Zusatz von mehrfach ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren, die bevorzugt in Fischölen vorkommen, zur Nahrung besonders wichtig. So werden beispielsweise mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Docosahexaensäure (= DHA, C22:6 <sup>$\Delta$ 4,7,10,13,16,19</sup>) oder Eicosapentaensäure (= EPA, C20:5 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14,17</sup>) Babynahrung zur Erhöhung des
- 10 Nährwertes zugesetzt. Der ungesättigten Fettsäure DHA wird dabei ein positiver Effekt auf die Entwicklung und Aufrechterhaltung von Gehirnfunktionen zugeschrieben. Es besteht aus diesem Grund ein Bedarf an der Produktion mehrfach ungesättigter langkettiger Fettsäuren.

- 15 Hauptsächlich werden die verschiedenen Fettsäuren und Triglyceride aus Mikroorganismen wie Mortierella oder Schizochytrium oder aus Öl-produzierenden Pflanzen wie Soja, Raps, Algen wie Cryptocodinium oder Phaeodactylum und weiteren gewonnen, wobei sie in der Regel in Form ihrer Triacylglyceride (= Triglyceride = Triglycerole) anfallen. Sie können aber auch aus Tieren wie z.B. Fischen gewonnen werden. Die freien Fettsäuren werden vorteilhaft durch Verseifung hergestellt. Sehr
- 20 langkettige mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie DHA, EPA, Arachidonsäure (= ARA, C20:4 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14</sup>), Dihomo- $\gamma$ -linolensäure (C20:3 <sup>$\Delta$ 8,11,14</sup>) oder Docosapentaensäure (DPA, C22:5 <sup>$\Delta$ 7,10,13,16,19</sup>) werden in Ölfuchtpflanzen wie Raps, Soja, Sonnenblume, Färbersaffor nicht synthetisiert. Übliche natürliche Quellen für diese Fettsäuren sind Fische wie Hering, Lachs, Sardine, Goldbarsch, Aal, Karpfen, Forelle, Heilbutt, Makrele,
- 25 Zander oder Thunfisch oder Algen.

- Je nach Anwendungszweck werden Öle mit gesättigten oder ungesättigten Fettsäuren bevorzugt. So werden z.B. in der humanen Ernährung Lipide mit ungesättigten Fettsäuren speziell mehrfach ungesättigten Fettsäuren bevorzugt. Den mehrfach ungesättigten  $\omega$ -3-Fettsäuren wird dabei ein positiver Effekt auf den Cholesterinspiegel
- 30 im Blut und damit auf die Möglichkeit der Prävention einer Herzerkrankung zugeschrieben. Durch Zugabe dieser  $\omega$ -3-Fettsäuren zur Nahrung kann das Risiko einer Herzerkrankung, eines Schlaganfalls oder von Bluthochdruck deutlich verringert werden. Auch entzündliche speziell chronisch entzündliche Prozesse im Rahmen immunologischer Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis lassen sich durch  $\omega$ -3-
- 35 Fettsäuren positiv beeinflussen. Sie werden deshalb Lebensmitteln speziell diätischen Lebensmitteln zugegeben oder finden in Medikamenten Anwendung.  $\omega$ -6-Fettsäuren wie Arachidonsäure haben bei diesen rheumatischen Erkrankungen aufgrund unserer üblichen Nahrungsmittelzusammensetzung eher einen negativen Effekt auf diese Krankheiten.
- 40 Aufgrund ihrer positiven Eigenschaften hat es in der Vergangenheit nicht an Ansätzen gefehlt, Gene, die an der Synthese von Fettsäuren bzw. Triglyceriden beteiligt sind, für

- die Herstellung von Ölen in verschiedenen Organismen mit geändertem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren verfügbar zu machen. So wird in WO 91/13972 und seinem US-Äquivalent eine  $\Delta$ -9-Desaturase beschrieben. In WO 93/11245 wird eine  $\Delta$ -15-Desaturase in WO 94/11516 wird eine  $\Delta$ -12-Desaturase beansprucht. Weitere
- 5 Desaturasen werden beispielsweise in EP-A-0 550 162, WO 94/18337, WO 97/30582, WO 97/21340, WO 95/18222, EP-A-0 794 250, Stukey et al., J. Biol. Chem., 265, 1990: 20144-20149, Wada et al., Nature 347, 1990: 200-203 oder Huang et al., Lipids 34, 1999: 649-659 beschrieben. Die biochemische Charakterisierung der verschie-
- 10 den Desaturasen ist jedoch bisher nur unzureichend erfolgt, da die Enzyme als membrangebundene Proteine nur sehr schwer zu isolieren und zu charakterisieren sind (McKeon et al., Methods in Enzymol. 71, 1981: 12141-12147, Wang et al., Plant Physiol. Biochem., 26, 1988: 777-792). In der Regel erfolgt die Charakterisierung membrangebundener Desaturasen durch Einbringung in einen geeigneten Organis-
- 15 mus, der anschließend auf Enzymaktivität mittels Edukt- und Produktanalyse untersucht wird.  $\Delta$ -6-Desaturasen werden in WO 93/06712, US 5,614,393, US5614393, WO 96/21022, WO00/21557 und WO 99/27111 beschrieben. Die Anwendung zur Produktion in transgenen Organismen wird in WO98/46763 WO98/46764, WO9846765 beschrieben. Die Expression verschiedener Desaturasen wird in WO99/64616 oder WO98/46776 beschrieben und beansprucht. Bzgl. der Effektivität der Expression von
- 20 Desaturasen und ihrem Einfluss auf die Bildung mehrfach ungesättigter Fettsäuren ist anzumerken, dass durch Expression einer einzelnen Desaturase wie bisher beschrieben lediglich geringe Gehalte an ungesättigten Fettsäuren/Lipiden wie z.B.  $\gamma$ -Linolensäure und Stearidonsäure erreicht wurden.
- In der Vergangenheit wurden zahlreiche Versuche unternommen, Elongase-Gene
- 25 zu erhalten. Millar and Kunst, 1997 (Plant Journal 12:121-131) und Millar et al., 1999 (Plant Cell 11:825-838) beschreiben die Charakterisierung von pflanzlichen Elongasen zur Synthese von einfach ungesättigten langkettigen Fettsäuren (C22:1) bzw. zur Synthese von sehr langkettigen Fettsäuren für die Wachsbildung in Pflanzen (C<sub>28</sub>-C<sub>32</sub>). Beschreibungen zur Synthese von Arachidonsäure und EPA finden sich beispielsweise
- 30 in WO 01/59128, WO 00/12720, WO 02/077213 und WO 02/08401. Die Synthese von mehrfach ungesättigter C24-Fettsäuren ist beispielsweise in Tvrdik et al. 2000, J. Cell Biol. 149:707-718 oder WO 02/44320 beschrieben.
- Besonders geeignete Mikroorganismen zur Herstellung von PUFAs sind Mikro-
- organismen wie Mikroalgen wie Phaeodactylum tricornutum, Porphyridium-Arten,
- 35 Thraustochytrien-Arten, Schizochytrien-Arten oder Crypthecodinium-Arten, Ciliaten, wie Styloynchia oder Colpidium, Pilze, wie Mortierella, Entomophthora oder Mucor und/oder Moosen wie Physcomitrella, Ceratodon und Marchantia (R. Vazhappilly & F. Chen (1998) Botanica Marina 41: 553-558; K. Totani & K. Oba (1987) Lipids 22: 1060-1062; M. Akimoto et al. (1998) Appl. Biochemistry and Biotechnology 73: 269-278).
- 40 Durch Stammselektion ist eine Anzahl von Mutantenstämmen der entsprechenden Mikroorganismen entwickelt worden, die eine Reihe wünschenswerter Verbindungen, einschließlich PUFAs, produzieren. Die Mutation und Selektion von Stämmen mit verbesserter Produktion eines bestimmten Moleküls wie den mehrfach ungesättigten

Fettsäuren ist jedoch ein zeitraubendes und schwieriges Verfahren. Deshalb werden, wann immer möglich wie oben beschrieben gentechnologische Verfahren bevorzugt. Mit Hilfe der vorgenannten Mikroorganismen lassen sich jedoch nur begrenzte Mengen der gewünschten mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie DPA, EPA oder ARA herstellen. Wobei diese in der Regel je nach verwendeten Mikroorganismus als Fettsäuregemische aus beispielsweise EPA, DPA und ARA anfallen.

Höhere Pflanzen enthalten mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Linolsäure (C18:2) und Linolensäure (C18:3). ARA, EPA und DHA kommen im Samenöl höherer Pflanzen gar nicht oder nur in Spuren vor (E. Ucciani: Nouveau Dictionnaire des Huiles Végétales. Technique & Documentation – Lavoisier, 1995. ISBN: 2-7430-0009-0). Es wäre jedoch vorteilhaft, in höheren Pflanzen, bevorzugt in Ölsaaten wie Raps, Lein, Sonnenblume und Soja, LCPUFAs herzustellen, da auf diese Weise große Mengen qualitativ hochwertiger LCPUFAs für die Lebensmittelindustrie, die Tierernährung und für pharmazeutische Zwecke kostengünstig gewonnen werden können. Hierzu werden vorteilhafterweise über gentechnische Methoden Gene, die für Enzyme der Biosynthese von LCPUFAs kodieren, in Ölsaaten eingeführt und exprimiert, vorteilhaft im Samen exprimiert. Dies sind Gene, die beispielsweise für  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen oder  $\Delta$ -4-Desaturasen kodieren. Diese Gene können vorteilhaft aus Mikroorganismen und niederen Pflanzen isoliert werden, die LCPUFAs herstellen und in den Membranen oder Triacylglyceriden einbauen. So konnten bereits  $\Delta$ -6-Desaturase-Gene aus dem Moos *Physcomitrella patens* und  $\Delta$ -6-Elongase-Gene aus *P. patens* und dem Nematoden *C. elegans* isoliert werden.

Für die Synthese von Arachidonsäure, Eicosapentaensäure (EPA) und Docosahexaensäure (DHA) werden verschiedene Synthesewege diskutiert (Figur. 1). So erfolgt die Produktion von EPA bzw. DHA in marinen Bakterien wie *Vibrio* sp. oder *Shewanella* sp. nach dem Polyketid-Weg (Yu, R. et al. *Lipids* 35:1061-1064, 2000; Takeyama, H. et al. *Microbiology* 143:2725-2731, 1997).

Ein alternative Strategie verläuft über die wechselnde Aktivität von Desaturasen und Elongasen (Zank, T.K. et al. *Plant Journal* 31:255-268, 2002; Sakuradani, E. et al. *Gene* 238:445-453, 1999). Eine Modifikation des beschriebenen Weges über  $\Delta$ 6-Desaturase,  $\Delta$ 6-Elongase,  $\Delta$ 5-Desaturase,  $\Delta$ 5-Elongase,  $\Delta$ 4-Desaturase ist der Sprecher-Syntheseweg (Sprecher 2000, *Biochim. Biophys. Acta* 1486:219-231) in Säugetieren. Anstelle der  $\Delta$ 4-Desaturierung erfolgt hier ein weiterer Elongationsschritt auf C<sub>24</sub>, eine weitere  $\Delta$ 6-Desaturierung und abschliessend eine  $\beta$ -Oxidation auf die C<sub>22</sub>-Kettenlänge. Für die Herstellung in Pflanzen und Mikroorganismen ist der sogenannte Sprecher-Syntheseweg (siehe Figur 1) allerdings nicht geeignet, da die Regulationsmechanismen nicht bekannt sind.

Die polyungesättigten Fettsäuren können entsprechend ihrem Desaturierungsmuster in zwei große Klassen, in  $\omega$ -6- oder  $\omega$ -3-Fettsäuren eingeteilt werden, die metabolisch und funktionell unterschiedlich Aktivitäten haben (Fig. 1).

Als Ausgangsprodukt für den  $\omega$ -6-Stoffwechselweg fungiert die Fettsäure Linolsäure ( $18:2^{\Delta 9,12}$ ), während der  $\omega$ -3-Weg über Linolensäure ( $18:3^{\Delta 9,12,15}$ ) abläuft. Linolensäure wird dabei durch Aktivität einer  $\omega$ -3-Desaturase gebildet (Tocher et al. 1998, Prog. Lipid Res. 37, 73-117 ; Domergue et al. 2002, Eur. J. Biochem. 269, 4105-4113).

- 5 Säugetiere und damit auch der Mensch verfügen über keine entsprechende Desaturaseaktivität ( $\Delta$ -12- und  $\omega$ -3-Desaturase) und müssen diese Fettsäuren (essentielle Fettsäuren) über die Nahrung aufnehmen. Über die Abfolge von Desaturase- und Elongase-Reaktionen werden dann aus diesen Vorstufen die physiologisch wichtigen polyungesättigten Fettsäuren Arachidonsäure (= ARA,  $20:4^{\Delta 5,8,11,14}$ ), eine  $\omega$ -6-Fettsäure  
10 und die beiden  $\omega$ -3-Fettsäuren Eicosapentaen- (= EPA,  $20:5^{\Delta 5,8,11,14,17}$ ) und Docosahexaensäure (DHA,  $22:6^{\Delta 4,7,10,13,17,19}$ ) synthetisiert. Die Applikation von  $\omega$ -3-Fettsäuren zeigt dabei die wie oben beschrieben therapeutische Wirkung bei der Behandlung von Herz-Kreislaufkrankheiten (Shimikawa 2001, World Rev. Nutr. Diet. 88, 100-108), Entzündungen (Calder 2002, Proc. Nutr. Soc. 61, 345-358) und Arthritis (Cleland und  
15 James 2000, J. Rheumatol. 27, 2305-2307).

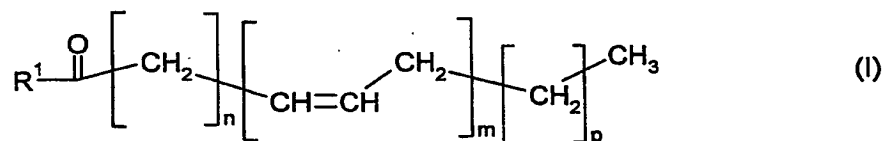
- Aus ernährungsphysiologischer Sicht ist es deshalb günstig eine Verschiebung zwischen dem  $\omega$ -6-Syntheseweg und dem  $\omega$ -3-Syntheseweg (siehe Figur 1) zu erreichen, so dass mehr  $\omega$ -3-Fettsäuren hergestellt werden. In der Literatur wurden die enzymatischen Aktivitäten verschiedener  $\omega$ -3-Desaturasen beschrieben, die  $C_{18:2}$ ,  
20  $C_{22:4}$ - oder  $C_{22:5}$ -Fettsäuren desaturieren (siehe Figur 1). Keine der biochemisch beschriebenen Desaturasen setzt jedoch ein breites Substratspektrum des  $\omega$ -6-Synthesewegs zu den entsprechenden Fettsäuren des  $\omega$ -3-Syntheseweg um.

- Die Verlängerung von Fettsäuren durch Elongasen um 2 bzw. 4 C-Atome ist für die Produktion von  $C_{20}$ - bzw.  $C_{22}$ -PUFAs von entscheidender Bedeutung. Dieser Prozess  
25 verläuft über 4 Stufen. Der erste Schritt stellt die Kondensation von Malonyl-CoA an das Fettsäure-Acyl-CoA durch die Ketoacyl-CoA-Synthase (KCS, im weiteren Text als Elongase bezeichnet). Es folgt dann ein Reduktionsschritt (Ketoacyl-CoA-Reduktase, KCR), ein Dehydratationsschritt (Dehydratase) und ein abschliessender Reduktionsschritt (enoyl-CoA-Reduktase). Es wurde postuliert, dass die Aktivität der Elongase  
30 die Spezifität und Geschwindigkeit des gesamten Prozesses beeinflussen (Millar and Kunst, 1997 Plant Journal 12:121-131).

- Zur Herstellung von DHA ( $C_{22:6}$  n-3) in Organismen, die diese Fettsäure natürlicherweise nicht produzieren, wurde bisher keine spezifische Elongase beschrieben. Bisher wurden nur Elongasen beschrieben, die  $C_{20}$ - bzw.  $C_{24}$ -Fettsäuren bereitstellen. Eine  $\Delta$ -  
35 5-Elongase-Aktivität wurde bisher noch nicht beschrieben.

- Erste transgene Pflanzen, die für Enzyme der LCPUFA-Biosynthese kodierende Gene enthalten und exprimieren und als Folge dessen LCPUFAs produzieren, wurden beispielsweise in DE 102 19 203 (Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren in Pflanzen) oder WO 2004/071467 beschrieben. Diese Pflanzen produzieren  
40 allerdings LCPUFAs in Mengen, die für eine Aufarbeitung der in den Pflanzen enthaltenen Öle noch weiter optimiert werden müssen. So beträgt der Gehalt von ARA

- in den in DE-A-102 19 203 beschriebenen Pflanzen lediglich 0,4 bis 2% und der Gehalt von EPA lediglich 0,5 bis 1%, jeweils bezogen auf den Gesamtlipidgehalt der Pflanze. In WO 2004/071467 werden höhere Gehalte an mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>- und C<sub>22</sub>-Fettsäuren, wie ARA, EPA oder DHA offenbart. Jedoch weist das offenbarte Verfahren
- 5 einige gravierende Nachteile auf. DHA lässt sich im offenbarten Verfahren offenbar überhaupt nicht im Samen nachweisen. Für eine Herstellung von PUFAs ist Soja aufgrund des geringen Ölgehalts von ca. nur 20 Gew.-% weniger geeignet. Soja ist eine vorteilhafte Proteinquelle und wird deshalb in großem Umfang angebaut. Der Ölgehalt von Soja ist jedoch eher gering. Weiterhin ist der im Herstellungsverfahren
- 10 erzielte Gehalt an Dihomo- $\gamma$ -linolensäure (=DGHL oder HGLA) viel zu hoch. In Fisch- oder Algenölen oder mikrobiellen Ölen ist HGLA kaum nachweisbar. Ein weiterer Nachteil ist, dass die in WO 2004/071467 offenbarten Pflanzen durch Cotransformation erzeugt wurden, dies führt zur Aufspaltung der Eigenschaften in den folgenden Generationen und damit zu einem erhöhten Selektionsaufwand.
- 15 Um eine Anreicherung der Nahrung und/oder des Futters mit diesen mehrfach ungesättigten Fettsäuren zu ermöglichen, besteht daher nachwievor ein großer Bedarf an einem einfachen, kostengünstigen Verfahren zur Herstellung dieser mehrfach ungesättigten Fettsäuren in pflanzlichen Systemen speziell im Samen von transgenen Pflanzen.
- 20 Daher bestand die Aufgabe der Erfindung darin, ein Verfahren zur Herstellung großer Mengen von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, speziell ARA, EPA und DHA, im Samen einer transgenen Pflanze zu entwickeln. Diese Aufgabe wurde durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I



25

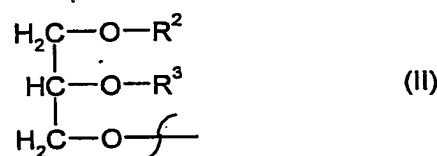
im Samen von transgenen Pflanzen mit einem Gehalt von mindestens 20 Gew.-% bezogen auf den Gesamtlipidgehalt, dass es folgende Verfahrensschritte umfasst:

- a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -9-Elongase- und/oder eine  $\Delta$ -6-Desaturase-Aktivität codiert, und
- 30 b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -8-Desaturase- und/oder eine  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität codiert, und
- c) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -5-Desaturase-Aktivität codiert, und

- d) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -5-Elongase-Aktivität codiert, und
- e) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -4-Desaturase-Aktivität codiert, und

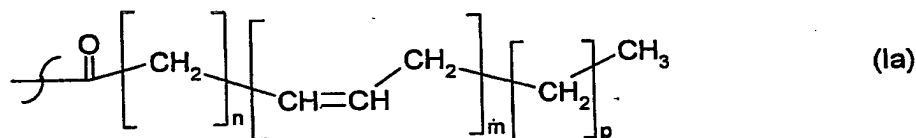
5 wobei die Variablen und Substituenten in der Formel I die folgende Bedeutung haben:

10  $R^1 =$  Hydroxyl-, CoenzymA-(Thioester), Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol-, Sphingobase-, oder einen Rest der allgemeinen Formel II



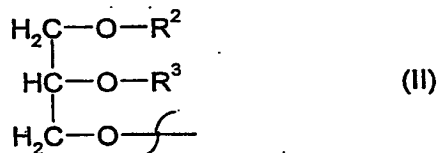
15  $R^2 =$  Wasserstoff-, Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol- oder gesättigtes oder ungesättigtes  $\text{C}_2\text{-C}_{24}$ -Alkylcarbonyl-,

$R^3 =$  Wasserstoff-, gesättigtes oder ungesättigtes  $\text{C}_2\text{-C}_{24}$ -Alkylcarbonyl-, oder  $\text{R}^2$  oder  $\text{R}^3$  unabhängig voneinander einen Rest der allgemeinen Formel Ia:



- 20  $n = 2, 3, 4, 5, 6, 7$  oder 9,  $m = 2, 3, 4, 5$  oder 6 und  $p = 0$  oder 3, gelöst. Vorteilhaft bedeuten die Variablen  $n$ ,  $m$  und  $p$  in den vorgenannten Formel I und Ia folgendes:  $n = 2, 3$  oder 5,  $m = 4, 5$  oder 6 und  $p = 0$  oder 3. In einer besonders vorteilhaften Ausführung des Verfahrens bedeuten die Variable  $n$ ,  $m$  und  $p$  in den Formeln I und Ia das folgende:  $m = 4$ ,  $n = 3$ ,  $p = 3$  und die Verbindungen der allgemeinen Formel I und Ia bedeuten damit Arachidonsäure und/oder  $m = 5$ ,  $n = 3$ ,  $p = 0$  und die Verbindungen der allgemeinen Formel I und Ia bedeuten damit Eicosapentaensäure und/oder  $m = 5$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0$  und die Verbindungen der allgemeinen Formel I und Ia bedeuten damit Docosapentaensäure ist und/oder  $m = 6$ ,  $n = 3$ ,  $p = 0$  und die Verbindungen der allgemeinen Formel I und Ia bedeuten damit Docosahexaensäure ist.

R<sup>1</sup> bedeutet in der allgemeinen Formel I Hydroxyl-, CoenzymA-(Thioester), Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol-, Sphingobase-, oder einen Rest der allgemeinen Formel II



5

Die oben genannten Reste von R<sup>1</sup> sind immer in Form ihrer Thioester an die Verbindungen der allgemeinen Formel I gebunden.

R<sup>2</sup> bedeutet in der allgemeinen Formel II Wasserstoff-, Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol- oder gesättigtes oder ungesättigtes C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl-,

10

Als Alkylreste seien substituiert oder unsubstituiert, gesättigt oder ungesättigte C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl-Ketten wie Ethylcarbonyl-, n-Propylcarbonyl-, n-Butylcarbonyl-, n-Pentylcarbonyl-, n-Hexylcarbonyl-, n-Heptylcarbonyl-, n-Octylcarbonyl-, n-Nonylcarbonyl-, n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-, n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Heptadecylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-, n-Docosanylcarbonyl- oder n-Tetracosanylcarbonyl- genannt, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Gesättigte oder ungesättigte C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-, n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Heptadecylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-, n-Docosanylcarbonyl- oder n-Tetracosanylcarbonyl-, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten, sind bevorzugt. Besonders bevorzugt sind gesättigte und/oder ungesättigte C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie C<sub>10</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>11</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>12</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>13</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>14</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>16</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>18</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>20</sub>-Alkylcarbonyl- oder C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Ganz besonders bevorzugt sind gesättigte oder ungesättigte C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie C<sub>16</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>18</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>20</sub>-Alkylcarbonyl- oder C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Diese vorteilhaften Reste können zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen enthalten. Die besonders vorteilhaften Reste mit 20 oder 22 Kohlenstoffatomen in der Fettsäurekette enthalten bis zu sechs Doppelbindungen, vorteilhaft drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, ganz besonders bevorzugt fünf oder sechs. Alle genannten Reste leiten sich von den entsprechenden Fettsäuren ab.

15

20

25

30

35



R<sup>3</sup> bedeutet in der allgemeinen Formel II Wasserstoff-, gesättigtes oder ungesättigtes C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl.

- Als Alkylreste seien substituiert oder unsubstituiert, gesättigt oder ungesättigte C<sub>2</sub>-C<sub>24</sub>-Alkylcarbonyl-Ketten wie Ethylcarbonyl-, n-Propylcarbonyl-, n-Butylcarbonyl-, n-Pentylcarbonyl-, n-Hexylcarbonyl-, n-Heptylcarbonyl-, n-Octylcarbonyl-, n-Nonylcarbonyl-, n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-, n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Heptadecylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-, n-Docosanylcarbonyl- or n-Tetracosanylcarbonyl- genannt, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Gesättigte oder ungesättigte C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie n-Decylcarbonyl-, n-Undecylcarbonyl-, n-Dodecylcarbonyl-, n-Tridecylcarbonyl-, n-Tetradecylcarbonyl-, n-Pentadecylcarbonyl-, n-Hexadecylcarbonyl-, n-Heptadecylcarbonyl-, n-Octadecylcarbonyl-, n-Nonadecylcarbonyl-, n-Eicosylcarbonyl-, n-Docosanylcarbonyl- oder n-Tetracosanylcarbonyl-, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten, sind bevorzugt. Besonders bevorzugt sind gesättigte und/oder ungesättigte C<sub>10</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie C<sub>10</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>11</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>12</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>13</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>14</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>16</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>18</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>20</sub>-Alkylcarbonyl- oder C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Ganz besonders bevorzugt sind gesättigte oder ungesättigte C<sub>16</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste wie C<sub>16</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>18</sub>-Alkylcarbonyl-, C<sub>20</sub>-Alkylcarbonyl- oder C<sub>22</sub>-Alkylcarbonylreste, die ein oder mehrere Doppelbindungen enthalten. Diese vorteilhaften Reste können zwei, drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen enthalten. Die besonders vorteilhaften Reste mit 20 oder 22 Kohlenstoffatomen in der Fettsäurekette enthalten bis zu sechs Doppelbindungen, vorteilhaft drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, ganz besonders bevorzugt fünf oder sechs. Alle genannten Reste leiten sich von den entsprechenden Fettsäuren ab.

Die oben genannten Reste von R<sup>1</sup>, R<sup>2</sup> and R<sup>3</sup> können mit Hydroxyl- und/oder Epoxygruppen substituierte sein und/oder können Dreifachbindungen enthalten.

- Vorteilhaft enthalten die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mindestens zwei vorteilhaft drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen. Besonders vorteilhaft enthalten die Fettsäuren vier fünf oder sechs Doppelbindungen. Im Verfahren hergestellte Fettsäuren haben vorteilhaft 18-, 20- oder 22-C-Atome in der Fettsäurekette, bevorzugt enthalten die Fettsäuren 20 oder 22 Kohlenstoffatome in der Fettsäurekette. Vorteilhaft werden gesättigte Fettsäuren mit den im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren wenig oder gar nicht umgesetzt. Unter wenig ist zu verstehen, das im Vergleich zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren die gesättigten Fettsäuren mit weniger als 5 % der Aktivität, vorteilhaft weniger als 3 %, besonders vorteilhaft mit weniger als 2 %, ganz besonders bevorzugt mit weniger als 1; 0,5; 0,25 oder 0,125 % umgesetzt werden. Diese hergestellten Fettsäuren können als einziges Produkt im Verfahren hergestellt werden oder in einem Fettsäuregemisch vorliegen.

Bei den im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen handelt es sich um isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- und/oder  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität codieren.

- 5 Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität codieren, verwendet ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
  - 10 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59,
    - 15 SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ
      - 20 ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 oder SEQ ID NO: 201 dargestellten Sequenz, oder
  - b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von den in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8,
    - 25 SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ
      - 30 ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 200 oder SEQ ID NO: 202 dargestellten Aminosäuresequenzen ableiten lassen, oder
  - c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27,
    - 40 SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37,

5 SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47,  
 SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61,  
 SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71,  
 SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81,  
 10 SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93,  
 SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO:  
 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ  
 ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO:  
 183, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 oder SEQ ID NO: 201  
 15 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 40 % Iden-  
 tität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ  
 ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ  
 ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ  
 ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ  
 20 ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46,  
 SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60,  
 SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70,  
 SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80,  
 SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92,  
 25 SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO:  
 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ  
 ID NO: 120, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO:  
 138, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 200 oder  
 SEQ ID NO: 202 codieren und eine  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-  
 30 Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-  
 Desaturaseaktivität aufweisen.

35 Vorteilhaft bedeuten die Substituenten  $R^2$  oder  $R^3$  in den allgemeinen Formeln I und II  
 unabhängig voneinander gesättigtes oder ungesättigtes  $C_{18}$ - $C_{22}$ -Alkylcarbonyl-,  
 besonders vorteilhaft bedeuten sie unabhängig voneinander ungesättigtes  $C_{18}$ -,  $C_{20}$ -  
 oder  $C_{22}$ -Alkylcarbonyl- mit mindestens zwei Doppelbindungen, vorteilhaft mit mindes-  
 tens drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders vorteilhaft mit mindestens  
 vier, fünf oder sechs Doppelbindungen.

35 Eine bevorzugte Ausführungsform des Verfahrens ist dadurch gekennzeichnet, dass  
 eine Nukleinsäuresequenz zusätzlich in die transgene Pflanze eingebracht wird, die für  
 Polypeptide mit  $\omega$ -3-Desaturase-Aktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe beste-  
 hend aus:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 87 oder SEQ ID NO: 105  
dargestellten Sequenz, oder
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen  
 40 Codes von der in SEQ ID NO: 88 oder SEQ ID NO: 106 dargestellten Aminosäure-  
 sequenz ableiten lassen, oder

- c) Derivate der in SEQ ID NO: 87 oder SEQ ID NO: 105 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 60 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 88 oder SEQ ID NO: 106 codieren und eine  $\omega$ 3-Desaturaseaktivität aufweisen.
- 5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform ist das Verfahren dadurch gekennzeichnet, dass eine Nukleinsäuresequenz zusätzlich in die transgene Pflanze eingebracht wird, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
- 10 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109 oder SEQ ID NO: 195 dargestellten Sequenz, oder
- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110 oder SEQ ID NO: 196 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 15 c) Derivate der in SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109 oder SEQ ID NO: 195 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 60 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110 oder SEQ ID NO: 196 codieren und eine  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität aufweisen.

20 Diese vorgenannten  $\Delta$ -12-Desaturasesequenzen können allein oder in Kombination mit den  $\omega$ 3-Desaturasesequenzen mit den im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen, die für  $\Delta$ -9-Elongasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen und/oder  $\Delta$ -4-Desaturasen codieren verwendet werden.

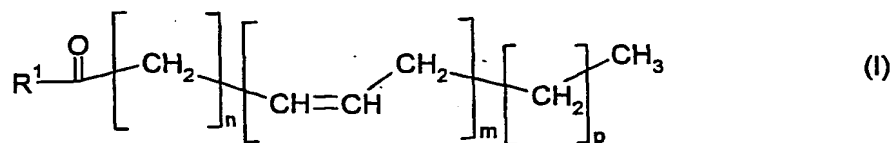
Tabelle 1 gibt die Nukleinsäuresequenzen, den Herkunftsorganismus und die Sequenz-ID-Nummer wieder.

Nr.	Organismus	Aktivität	Sequenznummer
1.	<i>Euglena gracilis</i>	$\Delta$ -8-Desaturase	SEQ ID NO: 1
2.	<i>Isochrysis galbana</i>	$\Delta$ -9-Elongase	SEQ ID NO: 3
3.	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 5
4.	<i>Ceratodon purpureus</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 7
5.	<i>Physcomitrella patens</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 9
6.	<i>Thraustochytrium</i> sp.	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 11
7.	<i>Mortierella alpina</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 13
8.	<i>Caenorhabditis elegans</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 15
9.	<i>Borago officinalis</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 17

Nr.	Organismus	Aktivität	Sequenznummer
10.	<i>Ceratodon purpureus</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 19
11.	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 21
12.	<i>Physcomitrella patens</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 23
13.	<i>Caenorhabditis elegans</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 25
14.	<i>Physcomitrella patens</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 27
15.	<i>Thraustochytrium</i> sp.	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 29
16.	<i>Phytophthora infestans</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 31
17.	<i>Mortierella alpina</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 33
18.	<i>Mortierella alpina</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 35
19.	<i>Caenorhabditis elegans</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 37
20.	<i>Euglena gracilis</i>	$\Delta$ -4-Desaturase	SEQ ID NO: 39
21.	<i>Thraustochytrium</i> sp.	$\Delta$ -4-Desaturase	SEQ ID NO: 41
22.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 43
23.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 45
24.	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 47
25.	<i>Cryptocodinium cohnii</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 49
26.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 51
27.	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 53
28.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 59
29.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 61
30.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 63
31.	<i>Thraustochytrium aureum</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 65
32.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 67
33.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 69
34.	<i>Primula farinosa</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 71
35.	<i>Primula vialii</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 73
36.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 75
37.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 77
38.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 79
39.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 81

Nr.	Organismus	Aktivität	Sequenznummer
40.	<i>Thraustrochytrium</i> sp.	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 83
41.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 85
42.	<i>Phytophthora infestans</i>	$\omega$ -3-Desaturase	SEQ ID NO: 87
43.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 89
44.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 91
45.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 93
46.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -4-Desaturase	SEQ ID NO: 95
47.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 97
48.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 99
49.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -5-Desaturase	SEQ ID NO: 101
50.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -4-Desaturase	SEQ ID NO: 103
51.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\omega$ -3-Desaturase	SEQ ID NO: 105
52.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -12-Desaturase	SEQ ID NO: 107
53.	<i>Thalassiosira pseudonana</i>	$\Delta$ -12-Desaturase	SEQ ID NO: 109
54.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 111
55.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 113
56.	<i>Xenopus laevis</i> (BC044967)	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 117
57.	<i>Ciona intestinalis</i> (AK112719)	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 119
58.	<i>Euglena gracilis</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 131
59.	<i>Euglena gracilis</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 133
60.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 135
61.	<i>Arabidopsis thaliana</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 137
62.	<i>Phaeodactylum tricornutum</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 183
63.	<i>Phytium irregulare</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 193
64.	<i>Calendula officinalis</i>	$\Delta$ -12-Desaturase	SEQ ID NO: 195
65.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -5-Elongase	SEQ ID NO: 197
66.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -6-Elongase	SEQ ID NO: 199
67.	<i>Ostreococcus tauri</i>	$\Delta$ -6-Desaturase	SEQ ID NO: 201

- In einer weiteren Ausführungsform der Erfindung wurde ein Verfahren zur Herstellung großer Mengen von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, speziell ARA und EPA, in einer transgenen Pflanze zu entwickeln. Dieses Verfahren ist ebenfalls zur Herstellung von DHA geeignet. So lassen sich im Verfahren ARA, EPA, DHA oder deren Mischungen herstellen. Eine weitere Ausführungsform der Erfindung ist somit ein Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I



in transgenen Pflanzen gelöst, wobei das Verfahren umfasst:

- a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in eine Pflanze, welche für ein Polypeptid mit der Aktivität einer  $\Delta$ -6-Desaturase-Aktivität kodiert, und ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
  - i) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 193 oder SEQ ID NO: 201 dargestellten Sequenz,
  - ii) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID NO: 194 oder SEQ ID NO: 202 angegebene Aminosäuresequenz kodieren,
  - iii) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID NO: 193 oder SEQ ID NO: 201 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und
  - iv) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID NO: 193 oder SEQ ID NO: 201 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind, und
- b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in eine Pflanze, welche für ein Polypeptid mit einer  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität kodiert, und ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
  - i) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 199 dargestellten Sequenz,
  - ii) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 200 angegebene Aminosäuresequenz kodieren,
  - iii) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 199 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und
  - iv) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 199 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind,

c) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in eine Pflanze, welche für ein Polypeptid mit einer  $\Delta$ -5-Desaturase-Aktivität kodiert, und ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- 5 i) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
- ii) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID NO: 12 angegebene Aminosäuresequenz kodieren,
- 10 iii) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID NO: 11 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und
- iv) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID NO: 11 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind,

wobei die Variablen und Substituenten in der Formel I die oben genannte Bedeutung haben.

15 Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendbaren Nukleinsäuresequenzen sind beschrieben in WO 02/26946 ( $\Delta$ -5-Desaturase aus *Thraustochytrium* ssp., SEQ ID NO: 11 und  $\Delta$ -6-Desaturase aus *Phytium irregulare*, SEQ ID NO: 193) sowie in WO 01/59128 ( $\Delta$ -6-Elongase aus *Physcomitrella patens*, SEQ ID NO: 27), auf die hier ausdrücklich Bezug genommen wird. Allerdings wurde in diesen Fällen die Bildung von

20 ARA und EPA entweder nicht in transgenen Pflanzen, sondern lediglich in Mikroorganismen untersucht, oder es konnte keine Steigerung der ARA- und EPA-Synthese in den transgenen Pflanzen nachgewiesen werden. Darüber hinaus wurden in diesen Anmeldungen die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren nicht mit Nukleinsäuren, die für andere Enzyme des Fettsäuresynthesewegs kodieren, kombiniert.

25 Es wurde nun überraschend gefunden, dass die Co-Expression der Nukleinsäuren mit den in SEQ ID NO: 11, 27, 193, 199 und 201 angegebenen Sequenzen in transgenen Pflanzen zu einer starken Erhöhung des ARA-Gehalts auf bis zu mehr als 8%, vorteilhaft bis zu mehr als 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% oder 20%, besonders vorteilhaft auf mehr als 21 %, 22%, 23%, 24% oder 25%,

30 bezogen auf den gesamten Lipidgehalt der Pflanze, führt (vgl. Tabelle 2, Tabelle 3, Tabelle 4 und Figur 31). Bei den vorgenannten Prozentwerten handelt es sich um Gewichtsprozentangaben.

Zur weiteren Steigerung der Ausbeute im beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triglyceriden mit einem vorteilhaft gegenüber Ölen und/oder Triglyceri-

35 den aus Wildtyp-Pflanzen erhöhten Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, vor allem von ARA, EPA oder DHA oder deren Mischungen, kann es vorteilhaft sein, die Menge des Ausgangsstoffs für die Fettsäuresynthese zu steigern. Dies kann beispielsweise durch das Einbringen einer Nukleinsäure, die für ein Polypeptid mit der Aktivität einer  $\Delta$ -12-Desaturase kodiert, und deren Co-Expression in dem Organismus

40 erreicht werden.



Dies ist besonders vorteilhaft in Öl-produzierenden Organismen wie der Familie der Brassicaceae wie der Gattung Brassica, z.B. Raps, Rübsen oder Sareptasenf; der Familie der Elaeagnaceae wie die Gattung Elaeagnus z.B. die Gattung und Art *Olea europaea* oder der Familie Fabaceae wie der Gattung Glycine z.B. die Gattung und Art  
5 *Glycine max*, die einen hohen Ölsäuregehalt, aber nur einen geringen Gehalt an Linolsäure aufweisen (Mikoklajczak et al., Journal of the American Oil Chemical Society, 38, 1961, 678 - 681).

Daher wird in einer bevorzugten Ausführungsform der vorliegenden Erfindung zusätzlich eine Nukleinsäuresequenz in die transgene Pflanze eingebracht, die für ein  
10 Polypeptid mit  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität kodiert.

Besonders bevorzugt ist diese Nukleinsäuresequenz ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:

- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 195 dargestellten Sequenz,
- 15 b) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID NO: 196 dargestellte Aminosäuresequenz kodieren,
- c) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID NO: 195 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und
- 20 d) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID NO: 195 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind.

Die Nukleinsäuresequenz mit der SEQ ID NO: 195 stammt aus *Calendula officinalis* und ist beschrieben in WO 01/85968, deren Offenbarung hier ebenfalls durch Bezugnahme in die vorliegende Anmeldung mit aufgenommen ist.

Vorteilhaft setzen die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturasen Ölsäure ( $C18:1^{\Delta 9}$ ) zu Linolsäure ( $C18:2^{\Delta 9,12}$ ) oder  $C18:2^{\Delta 6,9}$  zu  $C18:3^{\Delta 6,9,12}$  (Gammalinolensäure = GLA), den Ausgangssubstanzen für die Synthese von ARA, EPA und DHA um. Vorteilhaft setzen die verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturasen Fettsäuren gebunden an Phospholipide oder CoA-Fettsäureester, vorteilhaft gebunden an CoA-Fettsäureester, um. Dies führt, wenn vorher ein Elongationsschritt stattgefunden hat,  
25 vorteilhaft zu höheren Ausbeuten an Syntheseprodukten, da die Elongation in der Regel an CoA-Fettsäureestern erfolgt, während die Desaturierung überwiegend an den Phospholipiden oder an den Triglyceriden erfolgt. Ein Austausch, der eine weitere möglicherweise limitierende Enzymreaktion erforderlich machen würde, zwischen den CoA-Fettsäureestern und den Phospholipiden oder Triglyceriden ist somit nicht  
30 erforderlich.

Die zusätzliche Expression der  $\Delta$ -12-Desaturase in den transgenen Pflanzen führt zu einer weiteren Steigerung des ARA-Gehalts auf bis zu mehr als 10%, 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% oder 20%, besonders vorteilhaft auf mehr als 21 %, 22%, 23%, 24% oder 25%, bezogen auf den gesamten Lipidgehalt der Pflanze (vgl.

Tabelle 3 und 4 und Figur 32). Bei den vorgenannten Prozentwerten handelt es sich um Gewichtsprozentangaben.

Vorteilhaft können im erfindungsgemäßen Verfahren weitere Nukleinsäuresequenzen in die Pflanzen eingebracht werden, die für ein Polypeptid mit einer  $\Delta$ -5-Elongase-Aktivität kodieren.

Bevorzugt werden derartige Nukleinsäuresequenzen, die für  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität kodieren, ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:

- 10 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 197 dargestellten Sequenz,
- 15 b) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138 oder SEQ ID NO: 198 angegebene Aminosäuresequenz kodieren,
- 20 c) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 197 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und
- 25 d) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 197 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind.
- 30

35 In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens werden die  $\Delta$ -5-Elongase-Gene unter der Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimiert.

In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform des Verfahrens werden alle Nukleinsäuresequenzen auf einem gemeinsamen rekombinanten Nukleinsäuremolekül in die Pflanzen eingebracht werden, wobei jede Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines

eigenen Promotors steht kann und es sich bei diesem eigenen Promotor um einen samenspezifischen Promotor handeln kann.

Die Erfindung kann aber nicht nur mit den im Sequenzprotokoll angegebenen Nukleinsäuren erfolgreich umgesetzt werden, vielmehr können auch von diesen Sequenzen  
5 bis zu einem gewissen Grad abweichende Sequenzen, die für Proteine mit der im Wesentlichen gleichen enzymatischen Aktivität kodieren, eingesetzt werden. Hierbei handelt es sich um Nukleinsäuren, die zu den im Sequenzprotokoll spezifizierten Sequenzen einen bestimmten Identitäts- oder Homologiegrad aufweisen. Unter im  
10 wesentlichen gleiche enzymatische Aktivität sind Proteine zu verstehen, die mindestens 20%, 30%, 40%, 50% oder 60%, vorteilhaft mindestens 70%, 80%, 90% oder 95%, besonders vorteilhaft mindestens 96%, 97%, 98% oder 99% der enzymatischen Aktivität der Wildtyp-Enzyme aufweisen.

Zur Bestimmung der prozentualen Homologie (= Identität) von zwei Aminosäuresequenzen oder von zwei Nukleinsäuren werden die Sequenzen untereinander geschrieben (z.B. können Lücken in die Sequenz eines Proteins oder einer Nukleinsäure  
15 eingefügt werden, um ein optimales Alignment mit dem anderen Protein oder der anderen Nukleinsäure zu erzeugen). Die Aminosäurereste oder Nukleotide an den entsprechenden Aminosäurepositionen oder Nukleotidpositionen werden dann verglichen. Wenn eine Position in einer Sequenz durch den gleichen Aminosäurerest oder das gleiche Nukleotid wie die entsprechende Stelle in der anderen Sequenz  
20 belegt wird, dann sind die Moleküle an dieser Position homolog (d.h. Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Homologie", wie hier verwendet, entspricht Aminosäure- oder Nukleinsäure-"Identität"). Die prozentuale Homologie zwischen den beiden Sequenzen ist eine Funktion der Anzahl an Positionen, die den Sequenzen gemeinsam sind (d.h.  
25 % Homologie = Anzahl der identischen Positionen/Gesamtanzahl der Positionen x 100). Die Begriffe Homologie und Identität sind damit als synonym anzusehen.

Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für den Vergleich verschiedener Sequenzen stehen dem Fachmann eine Reihe von Programmen, die auf verschiedenen Algorithmen beruhen, zur  
30 Verfügung. Dabei liefern die Algorithmen von Needleman und Wunsch oder Smith und Waterman besonders zuverlässige Ergebnisse. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math.  
35 2; 482-489 (1981))], die im GCG Software-Packet [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind. Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm GAP über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 und Average Mismatch: 0.000. Diese  
40 Einstellungen wurden, falls nicht anders angegeben, immer als Standardeinstellungen für Sequenzvergleiche verwendet.

Der Fachmann erkennt, dass innerhalb einer Population DNA-Sequenzpolymorphismen, die zu Änderungen der Aminosäuresequenz der SEQ ID NO: 12, 28, 194, 196, 198, 200 und/oder 202 führen, auftreten können. Diese natürlichen Varianten bewirken üblicherweise eine Varianz von 1 bis 5 % in der Nukleotidsequenz des  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- und/oder  $\Delta$ -6-Elongase-Gens. Sämtliche und alle dieser Nukleotidvariationen und daraus resultierende Aminosäurepolymorphismen in der  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase und/oder  $\Delta$ -6-Elongase, die das Ergebnis natürlicher Variation sind und die die enzymatische Aktivität nicht wesentlich verändern, sollen im Umfang der Erfindung enthalten sein.

Unter wesentlicher enzymatischer Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -6-Elongase oder  $\Delta$ -5-Desaturase ist zu verstehen, dass sie gegenüber den durch die Sequenz und deren Derivate kodierten Proteinen/Enzymen im Vergleich noch eine enzymatische Aktivität von mindestens 10 %, bevorzugt von mindestens 20 %, besonders bevorzugt von mindestens 30 %, 40 %, 50 % oder mind. 60 % und am meisten bevorzugt von mindestens 70 %, 80 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % oder 99 % aufweisen und damit am Stoffwechsel von Verbindungen, die zum Aufbau von Fettsäuren, Fettsäureestern wie Diacylglyceriden und/oder Triacylglyceriden in einer Pflanze oder Pflanzenzelle benötigt werden oder am Transport von Molekülen über Membranen teilnehmen können, wobei  $C_{18}$ -,  $C_{20}$ - oder  $C_{22}$ -Kohlenstoffketten im Fettsäuremolekül mit Doppelbindungen an mindestens zwei, vorteilhaft drei, vier oder fünf Stellen gemeint sind.

Ebenfalls im Umfang der Erfindung enthalten sind Nukleinsäuremoleküle, die unter stringenten Bedingungen mit dem komplementären Strang der hier verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- und/oder  $\Delta$ -6-Elongase-Nukleinsäuren hybridisieren. Der Begriff "hybridisiert unter stringenten Bedingungen", wie hier verwendet, soll Hybridisierungs- und Waschbedingungen beschreiben, unter denen Nukleotidsequenzen, die mindestens 60 % homolog zueinander sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Die Bedingungen sind vorzugsweise derart, dass Sequenzen, die mindestens etwa 65 %, 70 %, 80 % oder 90 %, bevorzugt mindestens etwa 91 %, 92 %, 93 %, 94 % oder 95 % und besonders bevorzugt mindestens etwa 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder stärker zueinander homolog sind, gewöhnlich aneinander hybridisiert bleiben. Diese stringenten Bedingungen sind dem Fachmann bekannt und z.B. in Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, N. Y. (1989), 6.3.1-6.3.6, beschrieben.

Ein bevorzugtes, nicht einschränkendes Beispiel für stringente Hybridisierungsbedingungen sind Hybridisierungen in 6 x Natriumchlorid/Natriumcitrat (sodium chloride/sodium citrate = SSC) bei etwa 45°C, gefolgt von einem oder mehreren Waschschritten in 0,2 x SSC, 0,1 % SDS bei 50 bis 65°C. Dem Fachmann ist bekannt, dass sich diese Hybridisierungsbedingungen je nach dem Typ der Nukleinsäure und, wenn beispielsweise organische Lösungsmittel vorliegen, hinsichtlich der Temperatur und der Konzentration des Puffers unterscheiden. Die Hybridisierungstemperatur liegt

beispielsweise unter "Standard-Hybridisierungsbedingungen" je nach dem Typ der Nukleinsäure zwischen 42°C und 58°C in wässrigem Puffer mit einer Konzentration von 0,1 bis 5 x SSC (pH 7,2). Falls organisches Lösungsmittel, zum Beispiel 50 % Formamid, im obengenannten Puffer vorliegt, beträgt die Temperatur unter Standard-  
5 bedingungen etwa 42°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:DNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 20°C bis 45°C, vorzugsweise 30°C bis 45°C. Vorzugsweise sind die Hybridisierungsbedingungen für DNA:RNA-Hybride zum Beispiel 0,1 x SSC und 30°C bis 55°C, vorzugsweise 45°C bis 55°C. Die vorstehend  
10 genannten Hybridisierungstemperaturen sind für eine Nukleinsäure mit etwa 100 bp (= Basenpaare) Länge und einem G + C-Gehalt von 50 % in Abwesenheit von Formamid bestimmt. Der Fachmann weiß, wie die für eine bestimmte Nukleinsäure erforderlichen Hybridisierungsbedingungen anhand von Lehrbüchern, wie etwa Sambrook et al., "Molecular Cloning", Cold Spring Harbor Laboratory, 1989; Hames und Higgins (Hrsgb.) 1985, "Nucleic Acids Hybridization: A Practical Approach", IRL Press at Oxford  
15 University Press, Oxford; Brown (Hrsgb.) 1991, "Essential Molecular Biology: A Practical Approach", IRL Press at Oxford University Press, Oxford, bestimmt werden können.

Durch Einbringen einer oder mehrerer Nukleotidsubstitutionen, -additionen oder -deletionen in eine Nukleotidsequenz kann ein isoliertes Nukleinsäuremolekül erzeugt  
20 werden, das für eine  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase und/oder  $\Delta$ -6-Elongase mit einer oder mehreren Aminosäuresubstitutionen, -additionen oder -deletionen kodiert. Mutationen können in eine der Sequenzen durch Standard-techniken, wie stellenspezifische Mutagenese und PCR-vermittelte Mutagenese, eingebracht werden. Vorzugsweise werden konservative Aminosäuresubstitutionen an  
25 einem oder mehreren der vorhergesagten nicht-essentiellen Aminosäurereste hergestellt. Bei einer "konservativen Aminosäuresubstitution" wird der Aminosäurerest gegen einen Aminosäurerest mit einer ähnlichen Seitenkette ausgetauscht. Im Fachgebiet sind Familien von Aminosäureresten mit ähnlichen Seitenketten definiert worden. Diese Familien umfassen Aminosäuren mit basischen Seitenketten (z.B. Lysin, Arginin,  
30 Histidin), sauren Seitenketten (z.B. Asparaginsäure, Glutaminsäure), ungeladenen polaren Seitenketten (z.B. Glycin, Asparagin, Glutamin, Serin, Threonin, Tyrosin, Cystein), unpolaren Seitenketten, (z.B. Alanin, Valin, Leucin, Isoleucin, Prolin, Phenylalanin, Methionin, Tryptophan), beta-verzweigten Seitenketten (z.B. Threonin, Valin, Isoleucin) und aromatischen Seitenketten (z.B. Tyrosin, Phenylalanin, Tryptophan,  
35 Histidin). Ein vorhergesagter nicht-essentieller Aminosäurerest in einer  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase oder  $\Delta$ -6-Elongase wird somit vorzugsweise durch einen anderen Aminosäurerest aus der gleichen Seitenkettenfamilie ausgetauscht. Alternativ können bei einer anderen Ausführungsform die Mutationen zufallsgemäß über die gesamte oder einen Teil der für die  $\Delta$ -12-  
40 Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase oder  $\Delta$ -6-Elongase kodierenden Sequenz eingebracht werden, z.B. durch Sättigungsmutagenese, und die resultierenden Mutanten können durch rekombinante Expression nach der hier beschriebenen  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität durchmustert werden, um Mutanten zu identifizieren, die

die  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität beibehalten haben.

- Vorteilhaft enthalten die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mindestens zwei, bevorzugt drei, vier, fünf oder sechs
- 5 Doppelbindungen. Besonders bevorzugt enthalten die Fettsäuren vier, fünf oder sechs Doppelbindungen. Im Verfahren hergestellte Fettsäuren weisen bevorzugt eine Länge von 20C- oder 22C-Atomen auf.
- Vorteilhaft werden gesättigte Fettsäuren mit den im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren wenig oder gar nicht umgesetzt. Unter wenig ist zu verstehen, dass im Ver-
- 10 gleich zu mehrfach ungesättigten Fettsäuren die gesättigten Fettsäuren mit weniger als 5 %, bevorzugt mit weniger als 3 %, besonders bevorzugt mit weniger als 2 %, am meisten bevorzugt mit weniger als 1; 0,5; 0,25 oder 0,125 % der Aktivität umgesetzt werden. Die hergestellten Fettsäuren können das einzige Produkt des Verfahrens darstellen oder in einem Fettsäuregemisch vorliegen.
- 15 Die im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren sind vorteilhaft in Membranlipiden und/oder Triacylglyceriden gebunden, können aber auch als freie Fettsäuren oder aber gebunden in Form anderer Fettsäureester in den Organismen vorkommen. Dabei können sie als "Reinprodukte" oder aber vorteilhaft in Form von Mischungen verschiedener Fettsäuren oder Mischungen unterschiedlicher Glyceride
- 20 vorliegen. Die in den Triacylglyceriden gebundenen verschiedenen Fettsäuren lassen sich dabei von kurzkettigen Fettsäuren mit 4 bis 6 C-Atomen, mittelkettigen Fettsäuren mit 8 bis 12 C-Atomen oder langkettigen Fettsäuren mit 14 bis 24 C-Atomen ableiten, bevorzugt sind die langkettigen Fettsäuren besonders bevorzugt sind die langkettigen Fettsäuren LCPUFAs von C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren, ganz besonders bevor-
- 25 zugt sind die langkettigen Fettsäuren LCPUFAs von C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren wie ARA, EPA, DHA oder deren Kombination.

- Im erfindungsgemäßen Verfahren werden vorteilhaft Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremolekülen mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäureester, vorteilhaft mit mindestens drei, vier, fünf oder
- 30 sechs Doppelbindungen im Fettsäureester, besonders vorteilhaft von mindestens vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäureester, ganz besonders vorteilhaft von mindestens fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäureester hergestellt. Dies führt vorteilhaft zur Synthese von Linolsäure (=LA, C<sub>18</sub>:2 <sup>$\Delta$ 8,12</sup>),  $\gamma$ -Linolensäure (= GLA, C<sub>18</sub>:3 <sup>$\Delta$ 8,9,12</sup>), Stearidonsäure (= SDA, C<sub>18</sub>:4 <sup>$\Delta$ 8,9,12,15</sup>), Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure (= DGLA, C<sub>20</sub>:3 <sup>$\Delta$ 8,11,14</sup>),  $\omega$ -3-Eicosatetraensäure (= ETA, C<sub>20</sub>:4 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14</sup>), Arachidonsäure (ARA, C<sub>20</sub>:4 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14</sup>), Eicosapentaensäure (EPA, C<sub>20</sub>:5 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14,17</sup>), oder deren Mischungen synthetisiert, bevorzugt werden  $\omega$ -3-Eicosatetraensäure (= ETA, C<sub>20</sub>:4 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14</sup>), Arachidonsäure (ARA, C<sub>20</sub>:4 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14</sup>), Eicosapentaensäure (EPA, C<sub>20</sub>:5 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14,17</sup>),  $\omega$ -6-Docosapentaensäure (C<sub>22</sub>:5 <sup>$\Delta$ 4,7,10,13,16</sup>),  $\omega$ -6-Docosatetraensäure (C<sub>22</sub>:4 <sup>$\Delta$ 7,10,13,16</sup>),  $\omega$ -3-Docosapentaensäure (= DPA, C<sub>22</sub>:5 <sup>$\Delta$ 7,10,13,16,19</sup>), Docosahexaensäure (= DHA, C<sub>22</sub>:6 <sup>$\Delta$ 4,7,10,13,16,19</sup>) oder deren Mischungen, ganz besonders bevorzugt ARA, EPA
- 40

und/oder DHA hergestellt. Vorteilhaft werden  $\omega$ -3-Fettsäuren wie EPA und/oder DHA, bevorzugt DHA hergestellt.

Die Fettsäureester mit mehrfach ungesättigten  $C_{18}$ -,  $C_{20}$ - und/oder  $C_{22}$ -Fettsäuremolekülen vorteilhaft mit mehrfach ungesättigten  $C_{20}$ - und/oder  $C_{22}$ -Fettsäuremolekülen  
5 können aus den Pflanzen, die für die Herstellung der Fettsäureester verwendet wurden, in Form eines Öls oder Lipids beispielsweise in Form von Verbindungen wie Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide wie Glycosphingolipide, Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylcholin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol oder Diphosphatidylglycerol, Monoacylglyceride,  
10 Diacylglyceride, Triacylglyceride oder sonstige Fettsäureester wie die Acetyl-CoenzymA-Ester, die die mehrfach ungesättigten Fettsäuren mit mindestens zwei, drei, vier, fünf oder sechs, bevorzugt vier, fünf oder sechs, besonders bevorzugt fünf oder sechs Doppelbindungen enthalten, isoliert werden. Vorteilhaft werden sie in der Form ihrer Diacylglyceride, Triacylglyceride und/oder in Form des Phosphatidylcholin isoliert,  
15 besonders bevorzugt in der Form der Triacylglyceride isoliert. Neben diesen Estern sind die mehrfach ungesättigten Fettsäuren auch als freie Fettsäuren oder gebunden an andere Verbindungen in den Pflanzen enthalten. In der Regel liegen die verschiedenen vorgenannten Verbindungen (Fettsäureester und frei Fettsäuren) in den Organismen in einer ungefähren Verteilung von 80 bis 90 Gew.-% Triglyceride, 2 bis 5  
20 Gew.-% Diglyceride, 5 bis 10 Gew.-% Monoglyceride, 1 bis 5 Gew.-% freie Fettsäuren, 2 bis 8 Gew.-% Phospholipide vor, wobei sich die Summe der verschiedenen Verbindungen zu 100 Gew.-% ergänzt.

Im erfindungsgemäßen Verfahren bzw. in den erfindungsgemäßen Verfahren (der singular soll im Sinne der Erfindung und der hier dargestellten Offenbarung den plural  
25 umfassen und umgekehrt) werden die hergestellten LCPUFAs mit einem Gehalt von mindestens 3, 5, 6, 7 oder 8 Gew.-%, vorteilhaft von mindestens 9, 10, 11, 12, 13, 14 oder 15 Gew.-%, bevorzugt von mindestens 16, 17, 18, 19 oder 20 Gew.-%, besonders bevorzugt von mindestens 21, 22, 23, 24 oder 25 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt von mindestens 26, 27, 28, 29 oder 30 Gew.-% bezogen auf die gesamten  
30 Fettsäuren in den transgenen Organismen vorteilhaft im Samen der transgenen Pflanzen hergestellt. Dabei werden vorteilhaft  $C_{18}$ - und/oder  $C_{20}$ -Fettsäuren, die in den Wirtsorganismen vorhanden sind, zu mindestens 10 %, vorteilhaft zu mindestens 20 %, besonders vorteilhaft zu mindestens 30 %, ganz besonders vorteilhaft zu mindestens 40 % in die entsprechenden Produkte wie ARA, EPA, DPA oder DHA, um nur einige  
35 beispielhaft zu nennen, umgesetzt. Vorteilhaft werden die Fettsäuren in gebundener Form hergestellt.

Vorteilhaft werden dabei im Verfahren mehrfach ungesättigte  $C_{20}$ -Fettsäuren mit vier oder fünf Doppelbindungen im Molekül mit einem Gehalt von zusammen allen derartigen Fettsäuren von mindestens 15, 16, 17, 18, 19 oder 20 Gew.-%, vorteilhaft zu  
40 mindestens 21, 22, 23, 24 oder 25 Gew.-%, besonders vorteilhaft von mindestens 26, 27, 28, 29 oder 30 Gew.-% bezogen auf die gesamten Fettsäuren in den Samen der transgenen Pflanzen hergestellt.

- Vorteilhaft werden dabei im Verfahren mehrfach ungesättigte C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Molekül mit einem Gehalt von zusammen allen derartigen Fettsäuren von mindestens 15, 16, 17, 18, 19 oder 20 Gew.-%, vorteilhaft zu mindestens 21, 22, 23, 24 oder 25 Gew.-%, besonders vorteilhaft von mindestens 26, 27, 28, 29 oder 30 Gew.-%, ganz besonders vorteilhaft von mindestens 31, 32, 33, 34 oder 35 Gew.-% bezogen auf die gesamten Fettsäuren in den Samen der transgenen Pflanze hergestellt.

- Im erfindungsgemäßen Verfahren wird ARA mit einem Gehalt von mindestens 3, 5, 6, 7, 8, 9 oder 10 Gew.-%, vorteilhaft von mindestens 11, 12, 13, 14 oder 15 Gew.-%, bevorzugt von mindestens 16, 17, 18, 19 oder 20 Gew.-%, besonders bevorzugt von mindestens 21, 22, 23, 24 oder 25 Gew.-%, am meisten bevorzugt von mindestens 26 Gew.-%, bezogen auf den gesamten Lipidgehalt in den Samen der transgenen Pflanzen, hergestellt.

- EPA wird im erfindungsgemäßen Verfahren mit einem Gehalt von mindestens 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 oder 1 Gew.-%, vorteilhaft von mindestens 2, 3, 4 oder 5 Gew.-%, bevorzugt von mindestens 6, 7, 8, 9 oder 10 Gew.-%, besonders bevorzugt von mindestens 11, 12, 13, 14 oder 15 Gew.-% und am meisten bevorzugt von mindestens 16 Gew.-%, bezogen auf den gesamten Lipidgehalt in den Samen der transgenen Pflanzen, hergestellt.

- DHA wird im erfindungsgemäßen Verfahren mit einem Gehalt von mindestens 0,01 oder 0,02 Gew.-%, vorteilhaft von mindestens 0,03 oder 0,05 Gew.-%, bevorzugt von mindestens 0,09 oder 0,1 Gew.-%, besonders bevorzugt von mindestens 0,2 oder 0,3 Gew.-% und am meisten bevorzugt von mindestens 0,35 Gew.-%, bezogen auf den gesamten Lipidgehalt in den Samen der transgenen Pflanzen, hergestellt.

- Mit Hilfe der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren lassen sich diese ungesättigten Fettsäuren an sn1-, sn2- und/oder sn3-Position der vorteilhaft hergestellten Triglyceride bringen. Da im erfindungsgemäßen Verfahren von den Ausgangsverbindungen Linolsäure (C18:2) bzw. Linolensäure (C18:3) mehrere Reaktionsschritte durchlaufen werden, fallen die Endprodukte des Verfahrens wie beispielsweise Arachidonsäure (ARA), Eicosapentaensäure (EPA),  $\omega$ -6-Docosapentaensäure oder DHA nicht als absolute Reinprodukte an, es sind immer auch geringe Spuren der Vorstufen im Endprodukt enthalten. Sind in dem Ausgangsorganismus bzw. in der Ausgangspflanze beispielsweise sowohl Linolsäure als auch Linolensäure vorhanden, so liegen die Endprodukte wie ARA, EPA oder DHA als Mischungen vor. Vorteilhaft sollten in den Endprodukten ARA oder DHA nur geringe Mengen, der jeweils anderen Endprodukte vorhanden sein. In einem DHA haltigen Lipid und/oder Öl sollten deshalb weniger als 15, 14, 13, 12 oder 11 Gew.-%, vorteilhaft weniger als 10, 9, 8, 7, 6 oder 5 Gew.-%, besonders vorteilhaft weniger als 4, 3, 2 oder 1 Gew.-% EPA und/oder ARA enthalten sein. In einem EPA haltigen Lipid und/oder Öl sollten deshalb weniger als 15, 14, 13, 12 oder 11 Gew.-%, vorteilhaft weniger als 10, 9, 8, 7, 6 oder 5 Gew.-%, besonders vorteilhaft weniger als 4, 3, 2 oder



1 Gew.-% ARA enthalten sein. Auch in einem ARA haltigen Lipid und/oder Öl sollten deshalb weniger als 15, 14, 13, 12 oder 11 Gew.-%, vorteilhaft weniger als 10, 9, 8, 7, 6 oder 5 Gew.-%, besonders vorteilhaft weniger als 4, 3, 2 oder 1 Gew.-% EPA und/oder DHA enthalten sein.

- 5 Es können aber auch Mischungen von verschiedenen mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren in einem Produkt wünschenswert sein. In solchen Fällen können DHA haltige Lipide und/oder Öle mindestens 1, 2, 3, 4 oder 5 Gew.-% ARA und/oder EPA, vorteilhaft mindestens 6, 7 oder 8 Gew.-%, besonders vorteilhaft mindestens 9, 10, 11, 12, 13, 14 oder 15 Gew.-%, ganz besonders vorteilhaft mindestens 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 oder 25 Gew.-% bezogen auf den gesamten Lipidgehalt in den Samen der transgenen Pflanzen enthalten.

- Die Vorstufen sollten vorteilhaft nicht mehr als 20 Gew.-%, bevorzugt nicht mehr als 15 Gew.-%, besonders bevorzugt nicht als 10 Gew.-%, ganz besonders bevorzugt nicht mehr als 5 Gew.-% bezogen auf die Menge des jeweiligen Endprodukts betragen.
- 15 Vorteilhaft werden in einer transgenen Pflanze als Endprodukte nur ARA, EPA oder nur DHA im erfindungsgemäßen Verfahren gebunden oder als freie Säuren hergestellt. Werden die Verbindungen ARA, EPA und DHA gleichzeitig hergestellt, werden sie vorteilhaft in einem Verhältnis von mindesten 1:1:2 (EPA:ARA:DHA), vorteilhaft von mindestens 1:1:3, bevorzugt von 1:1:4, besonders bevorzugt von 1:1:5 hergestellt.
- 20 Werden die Verbindungen ARA und EPA gleichzeitig hergestellt, werden sie vorteilhaft in einem Verhältnis von mindestens 1:6 (EPA:ARA), vorteilhaft von mindestens 1:8, bevorzugt von mindestens 1:10, besonders bevorzugt von mindestens 1:12 in der Pflanze hergestellt.

- 25 Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, enthalten vorteilhaft 6 bis 15 % Palmitinsäure, 1 bis 6 % Stearinsäure; 7 – 85 % Ölsäure; 0,5 bis 8 % Vaccensäure, 0,1 bis 1 % Arachinsäure, 7 bis 25 % gesättigte Fettsäuren, 8 bis 85 % einfach ungesättigte Fettsäuren und 60 bis 85 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren jeweils bezogen auf 100 % und auf den Gesamtfettsäuregehalt der Organismen.

- 30 Weiterhin enthalten die Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, vorteilhaft Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe der Fettsäuren Erucasäure (13-Docosaensäure), Sterculinsäure (9,10-Methylene octadec-9-enonsäure), Malvalinsäure (8,9-Methylen Heptadec-8-enonsäure), Chaulmoogrinsäure (Cyclopenten-dodecansäure), Furan-Fettsäure (9,12-Epoxy-octadeca-9,11-dienonsäure), Vernonsäure (9,10-Epoxyoctadec-12-enonsäure), Tarinsäure (6-Octadecynonsäure), 6-Nonadecynonsäure, Santalbinsäure (t11-Octadecen-9-ynoic acid), 6,9-Octadecenynonsäure, Pyrulinsäure (t10-Heptadecen-8-ynonsäure), Crepenyninsäure (9-Octadecen-12-ynonsäure), 13,14-Dihydrooropheinsäure, Octadecen-13-ene-9,11-dienonsäure, Petroselensäure (cis-6-Octadecenonsäure), 9c,12t-Octadecadiensäure, Calendulasäure (8t10t12c-Octadecatriensäure), Catalpinsäure (9t11t13c-Octadecatriensäure), Eleosterinsäure

(9c11t13t-Octadecatriensäure), Jacarinsäure (8c10t12c-Octadecatriensäure), Punicinsäure (9c11t13c-Octadecatriensäure), Parinarinsäure (9c11t13t15c-Octadecatetraensäure), Pinolensäure (all-cis-5,9,12-Octadecatriensäure), Laballensäure (5,6-Octadecadienallensäure), Ricinolsäure (12-Hydroxyölsäure) und/oder Coriolinsäure (13-Hydroxy-9c,11t-Octadecadienonsäure). Die vorgenannten Fettsäuren kommen in den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemischen in der Regel vorteilhaft nur in Spuren vor, das heißt sie kommen bezogen auf die Gesamtfettsäuren zu weniger als 30 %, bevorzugt zu weniger als 25 %, 24 %, 23 %, 22 % oder 21 %, besonders bevorzugt zu weniger als 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % oder 5 %, ganz besonders bevorzugt zu weniger als 4 %, 3 %, 2 % oder 1 % vor. In einer weiteren bevorzugten Form der Erfindung kommen diese vorgenannten Fettsäuren bezogen auf die Gesamtfettsäuren zu weniger als 0,9%; 0,8%; 0,7%; 0,6%; oder 0,5%, besonders bevorzugt zu weniger als 0,4%; 0,3%; 0,2%; 0,1% vor. Vorteilhaft enthalten die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische weniger als 0,1 % bezogen auf die Gesamtfettsäuren und/oder keine Buttersäure, kein Cholesterin, keine Clupanodonsäure (= Docosapentaensäure, C22:5<sup>Δ4,8,12,15,21</sup>) sowie keine Nisinsäure (Tetracosahexaensäure, C23:6<sup>Δ3,8,12,15,18,21</sup>).

Durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen bzw. im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen kann eine Steigerung der Ausbeute an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, vor allem an ARA und EPA aber auch DHA, von mindestens 50, 80 oder 100 %, vorteilhaft von mindestens 150, 200 oder 250 %, besonders vorteilhaft von mindestens 300, 400, 500, 600, 700, 800 oder 900 %, ganz besonders vorteilhaft von mindestens 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 oder 1500 % gegenüber der nicht transgenen Ausgangspflanze beispielsweise einer Pflanze wie Brassica juncea, Brassica napus, Camelina sativa, Arabidopsis thaliana oder Linum usitatissimum beim Vergleich in der GC-Analyse siehe Beispiele erreicht werden.

Vorteilhaft werden, wie oben beschrieben, die im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Molekül im Samen von Pflanzen, die keine oder nur sehr geringe Mengen an C12:0- bzw. C14:0-Fettsäuren enthalten. Auch noch kürzere gesättigte Fettsäuren wie die Fettsäuren C4:0, C6:0, C8:0 oder C10:0 sollten nicht oder nur in geringen Mengen im Lipid und/oder Öl vorhanden sein. Unter nur sehr geringen Mengen sind vorteilhaft Mengen zu verstehen, die in der GC-Analyse vorteilhaft unter 5, 4, 3, 2 oder 1 %, vorteilhaft unter 0,9; 0,8; 0,7; 0,6 oder 0,5 %, besonders vorteilhaft unter 0,4; 0,3; 0,2 oder 0,1 %, ganz besonders bevorzugt unter 0,09; 0,08; 0,07; 0,06; 0,05; 0,04; 0,03; 0,02 oder 0,01 Flächeneinheiten in der GC liegen. Die Fettsäure C16:0 sollte vorteilhaft in einem Bereich von 1 bis 28 % GC-Flächeneinheiten liegen. Vorteilhaft sollte die Fettsäure C16:0 in GC-Flächeneinheiten von weniger als 25%, 20%, 15% oder 10%, vorteilhaft von weniger als 9%, 8%, 7%, 6% oder 5%, besonders vorteilhaft von weniger als 4%, 3%, 2% oder 1% oder gar nicht in den Lipiden, Ölen und/oder freien Fettsäuren vorhanden sein. Die Fettsäure C16:1 sollte vorteilhaft weniger als 1; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 oder 0,1 %, besonders vorteilhaft 0,09; 0,08; 0,07; 0,06; 0,05; 0,04; 0,03;

0,02 oder 0,01 Flächeneinheiten in der GC betragen. Ganz besonders bevorzugt sollte die Fettsäure C16:1 nicht in den nach dem Verfahren hergestellten Ölen und/oder Lipiden vorhanden sein. Gleiches gilt für die Fettsäuren C15:0, C17:0, C16:1<sup>Δ3</sup>trans, C16:4<sup>Δ4,7,10,13</sup> und C18:5<sup>Δ3,6,9,12,15</sup>. Neben Ölsäure (C18:1<sup>Δ9</sup>) können auch die Isomere (C18:1<sup>Δ7</sup>, C18:1<sup>Δ11</sup>) in den Lipiden, Ölen oder freien Fettsäuren vorhanden sein. 5 Vorteilhaft in Mengen, gemessen als GC-Flächeneinheiten, von weniger als 5%, 4%, 3%, 2% oder 1%. Die Fettsäuren C20:0, C20:1, C24:0 und C24:1 sollten jeweils in einem Bereich von 0 bis 1 %, 0 bis 3% bzw. 0 bis 5 % Flächeneinheiten in der GC liegen. Weiterhin sollte in der GC-Analyse wenig Dihomo-γ-linolensäure (= DGLA) im 10 Samenöl und/oder -lipid in GC-Flächeneinheiten detektierbar sein. Unter wenig sind weniger als 2; 1,9; 1,8; 1,7; 1,6 oder 1,5 %, vorteilhaft weniger als 1,4; 1,3; 1,2; 1,1 oder 1 %, besonders vorteilhaft weniger als 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5 oder 0,4 % in GC-Flächeneinheiten zu verstehen.

15 In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens sollte DGLA und ARA in einem Verhältnis von 1:1 bis zu 1:100, vorteilhaft von 1:2 bis zu 1:80, besonders vorteilhaft von 1:3 bis zu 1:70, ganz besonders bevorzugt von 1:5 bis zu 1:60 entstehen.

In weiteren bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens sollte DGLA und EPA in einem Verhältnis von 1:1 bis zu 1:100, vorteilhaft von 1:2 bis zu 1:80, besonders vorteilhaft von 1:3 bis zu 1:70, ganz besonders bevorzugt von 1:5 bis zu 1:60 entstehen. 20

Vorteilhaft sollten die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Lipide und/oder Öle einen hohen Anteil von ungesättigten Fettsäuren vorteilhaft von mehrfach ungesättigten Fettsäuren von mindestens 30, 40 oder 50 Gew.-%, vorteilhaft von mindestens 60, 70 oder 80 Gew.-% bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt in den Samen der transgenen Pflanzen betragen. 25

Alle gesättigten Fettsäuren zusammen sollten vorteilhaft in den für das erfindungsgemäße Verfahren bevorzugt verwendeten Pflanzen nur einen geringen Anteil ausmachen. Unter geringen Anteil ist in diesem Zusammenhang ein Anteil in GC-Flächeneinheiten von weniger als 15%, 14%, 13%, 12%, 11% oder 10%; bevorzugt von weniger als 9%, 8%, 7% oder 6% zu verstehen. 30

Weiterhin sollten die im Verfahren vorteilhaft als Wirtspflanzen, die die über verschiedene Methoden eingebrachten im Verfahren verwendeten Gene zur Synthese der mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthalten, vorteilhaft einen höheren Ölanteil als Proteinanteil im Samen haben, vorteilhafte Pflanzen haben einen Öl-/Proteingehaltverhältnis von 5 zu 1, 4 zu 1, 3 zu 1, 2 zu 1 oder 1 zu 1. Dabei sollte der Ölgehalt bezogen auf das Gesamtgewicht des Samens in einem Bereich von 15 – 55%, vorteilhaft zwischen 25 – 50%, besonders vorteilhaft zwischen 35 – 50% liegen. 35

Vorteilhafte im Verfahren verwendete Wirtspflanzen sollten am Triglycerid in sn1-, sn2- und sn3-Position eine Verteilung der ungesättigten Fettsäuren wie Ölsäure, Linolsäure und Linolensäure, die die Ausgangsverbindungen im erfindungsgemäßen Verfahren 40

zur Synthese mehrfach ungesättigter Fettsäuren sind, wie in der folgenden Tabelle 5 dargestellt haben, wobei die Zeilen Nr. 1 – 7 verschiedene vorteilhafte Alternativen derartiger Verteilungen wiedergeben. Die Bezeichnung n.v. bedeutet nicht vorhanden.

5 Tabelle 5: Pflanzen mit vorteilhafter Fettsäureverteilung in sn1-, sn2- und sn3-Position am Triglycerid

Nr.	Ölsäure			Linolsäure			$\alpha$ -Linolensäure		
	sn1	sn2	sn3	sn1	sn2	sn3	sn1	sn2	sn3
1.	1	1	1	2	4	1	n.v.	n.v.	n.v.
2.	1,4	2,2	1	2,8	9	1	2	6,7	1
3.	0,8	0,8	1	1,1	1,6	1	1	0,8	1
4.	0,9	0,9	1	1,2	1,6	1	0,9	1	1
5.	0,9	0,9	1	1	1,3	1	1	1	1
6.	1	1,1	1	2	2,8	1	1	1	n.v.
7.	1,3	9,7	1	1	9	Spuren	1	n.v.	n.v.

Die Zeilen geben die Verhältnisse der folgenden Pflanzen wieder: Zeile 1 = *Arachis hypogaea*, Zeile 2 = *Brassica napus*, Zeile 3 = *Glycine max*, Zeile 4 = *Linum usitatissimum*, Zeile 5 = *Zea mays*, Zeile 6 = *Olea europaea* und Zeile 7 = *Theobroma cacao*.

- 10 Für das Verfahren vorteilhafte Wirtspflanzen sind solche, die einen hohen Anteil an Ölsäure, das heißt von mindestens 40, 50, 60 oder 70 Gew.-% bezogen auf den gesamten Fettsäuregehalt der Pflanze haben, im Vergleich zu Linolsäure und/oder Linolensäure in den Lipiden und/oder Ölen besonders im Triglycerid haben wie z.B. *Anacardium occidentale*, *Argania spinosa*, *Bombax malabaricum*, *Brassica napus*, *Butyrospermum parkii*, hoch Ölsäure Distel (*Carthamus tinctorius*), *Citrullus colocythis*,  
 15 *Corylus avellana*, *Curcubita foetidissima*, *Curcubita pepo*, *Guizotia abyssinica*, hoch Ölsäure Sonnenblume (*Helianthus annuus*), *Macadamia intergrifolia*, *Nigella sativa*, *Olea europaea*, *Papaver somniferum*, *Passiflora edulis*, *Persea americana*, *Prunus amygdala*

lis, *Prunus armeniaca*, *Prunus dulcis*, *Prunus communis*, *Sesamum indicum*, *Simarouba glauca*, *Thea sasungua*, oder *Theobroma cacao*. Weitere vorteilhafte Pflanzen haben einen höheren Anteil der ungesättigten Fettsäuren Ölsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure in sn2-Position im Vergleich zu den anderen Positionen sn1 und sn3.

- 5 Unter höheren Anteil sind Verhältnisse von (sn1:sn2:sn3) 1:1,1:1; 1:1,5:1 bis 1:3:1 zu verstehen. Vorteilhafte Pflanzen wie *Actinidia chinensis*, *Aleurites moluccana*, *Arnebia griffithii*, *Brassica alba*, *Brassica hirta*, *Brassica nigra*, *Brassica juncea*, *Brassica carinata*, *Camelina sativa*, *Cannabis sativa*, *Echium rubrum*, *Echium vulgare*, *Humulus lupulus*, *Juglans regia*, *Linum usitatissimum*, *Ocimum* spp., *Perilla frutescens*, *Portulaca oleracea*, *Prunus cerasus*, *Salicornia bigelovii*, *Salvia hispanica* sind auch solche die
- 10 einen hohen Anteil an  $\alpha$ -Linolensäure im Lipid und/oder Öl der Pflanze aufweisen, das heißt eine Anteil an  $\alpha$ -Linolensäure von mindestens 10, 15 oder 20 Gew.-%, vorteilhaft von mindestens 25, 30, 35, 40, 45 oder 50 Gew.-% bezogen auf den gesamten Fettsäuregehalt der Pflanze aufweisen. Ganz besonders vorteilhafte Pflanzen zeigen
- 15 für die im Verfahren hergestellte Arachidonsäure, Eicosapentaensäure oder Docosahexaensäure ebenfalls eine Präferenz für die sn2-Position im Triglycerid gegenüber den Positionen sn1 und sn3 von vorteilhaft 1:1,1:1; 1:1,5:1 bis 1:3:1.

Für das Verfahren verwendete Pflanzen sollten vorteilhaft einen Gehalt an Erucasäure von weniger als 2 Gew.-% bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt der Pflanze haben.

- 20 Auch sollte der Gehalt an gesättigten Fettsäuren C16:0 und/oder C18:0 vorteilhaft geringer als 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, oder 10 Gew.-%, vorteilhaft weniger als 9, 8, 7, 6 oder 5 Gew.-% bezogen auf den gesamten Fettsäuregehalt der Pflanze sein. Vorteilhaft sollten auch längere Fettsäuren wie C20:0 oder C22:1 gar nicht oder in nur geringen Mengen vorteilhaft geringer als 4, 3, 2 oder 1 Gew.-%, vorteilhaft weniger als
- 25 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 oder 0,1 Gew.-% bezogen auf den gesamten Fettsäuregehalt der Pflanze in den im Verfahren verwendeten Pflanzen vorhanden sein. Typischerweise ist in den für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Pflanzen kein oder nur in geringen Mengen C16:1 als Fettsäure enthalten. Unter geringen Mengen sind vorteilhaft Gehalte an Fettsäuren zu verstehen, die geringer als
- 30 4, 3, 2 oder 1 Gew.-%, vorteilhaft weniger als 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 oder 0,1 Gew.-% bezogen auf den gesamten Fettsäuregehalt der Pflanze sind.

Aus wirtschaftlichen Gründen, das heißt aufgrund der Anbaufläche und Ölerträge werden Pflanzen bevorzugt, die auf großen Flächen angebaut werden, wie Soja, Raps, Senf, *Camelina*, Lein, Sonnenblume, Ölpalme, Baumwolle, Sesam, Mais, Olive

35 bevorzugt Raps, *Camelina*, Lein, Sonnenblume im Verfahren als Wirtspflanze gern genommen.

- Auch chemisch reine mehrfach ungesättigte Fettsäuren oder Fettsäurezusammensetzungen sind nach den vorbeschriebenen Verfahren darstellbar. Dazu werden die Fettsäuren oder die Fettsäurezusammensetzungen aus den Pflanzen vorteilhaft den
- 40 Pflanzensamen in bekannter Weise beispielsweise über aufbrechen der Samen wie Mahlen und anschließender Extraktion, Destillation, Kristallisation, Chromatographie oder Kombinationen dieser Methoden isoliert. Diese chemisch reinen Fettsäuren oder

Fettsäurezusammensetzungen sind für Anwendungen im Bereich der Lebensmittel-industrie, der Kosmetikindustrie und besonders der Pharmaindustrie vorteilhaft.

Als Pflanzen für das erfindungsgemäße Verfahren kommen prinzipiell alle Pflanzen in Frage, die in der Lage sind Fettsäuren zu synthetisieren wie alle dicotylen oder  
 5 monokotylen Pflanzen, Algen oder Moose. Vorteilhaft Pflanzen sind ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzenfamilien Adelotheciaceae, Anacardiaceae, Asteraceae, Apiaceae, Betulaceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Bromeliaceae, Caricaceae, Cannabaceae, Compositae, Convolvulaceae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Elaeagnaceae, Ericaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Gramineae, Juglandaceae,  
 10 Lauraceae, Leguminosae, Linaceae, Malvaceae, Moringaceae, Marchantiaceae, Onagraceae, Olacaceae, Oleaceae, Papaveraceae, Piperaceae, Pedaliaceae, Poaceae, Rosaceae oder Solanaceae, vorteilhaft Anacardiaceae, Asteraceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Cannabaceae, Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Elaeagnaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Gramineae, Leguminosae,  
 15 Linaceae, Malvaceae, Moringaceae, Marchantiaceae, Onagraceae, Olacaceae, Oleaceae, Papaveraceae, Piperaceae, Pedaliaceae, Poaceae oder Solanaceae. Aber auch Gemüsepflanzen oder Zierpflanzen wie Tagetes kommen für das Verfahren in Betracht.

Beispielhaft seien die folgenden Pflanzen genannt ausgewählt aus der Gruppe:  
 20 Anacardiaceae wie die Gattungen Pistacia, Mangifera, Anacardium z.B. die Gattung und Arten *Pistacia vera* [Pistazie], *Mangifer indica* [Mango] oder *Anacardium occidentale* [Cashew], Asteraceae wie die Gattungen Artemisia, Calendula, Carthamus, Centaurea, Cichorium, Cynara, Helianthus, Lactuca, Locusta, Tagetes, Valeriana z.B. die Gattung und Arten Artemisia sphaerocephala, Calendula officinalis [Garten-  
 25 Ringelblume], Carthamus tinctorius [Färberdistel, safflower], *Centaurea cyanus* [Kornblume], *Cichorium intybus* [Wegwarte], *Cynara scolymus* [Artichoke], *Helianthus annuus* [Sonnenblume], *Lactuca sativa*, *Lactuca crispera*, *Lactuca esculenta*, *Lactuca scariola* L. ssp. *sativa*, *Lactuca scariola* L. var. *integrata*, *Lactuca scariola* L. var. *integrifolia*, *Lactuca sativa* subsp. *romana*, *Locusta communis*, *Valeriana locusta*  
 30 [Salat], *Tagetes lucida*, *Tagetes erecta* oder *Tagetes tenuifolia* [Studentenblume], Apiaceae wie die Gattung Daucus z.B. die Gattung und Art *Daucus carota* [Karotte], Betulaceae wie die Gattung Corylus z.B. die Gattungen und Arten *Corylus avellana* oder *Corylus colurna* [Haselnuss], Boraginaceae wie die Gattung Adelocaryum, Alkanna, Anchusa, Borago, Brunnera, Cerinthe, Cynoglossum, Echium, Gastrocatyle,  
 35 Lithospermum, Moltkia, Nonea, Onosma, Onosmodium, Paracaryum, Pectocarya, Symphytum z.B. die Gattung und Art Adelocaryum coelestinum, Alkanna orientalis, Anchusa anzurea, Anchusa capensis, Anchusa hybrida, *Borago officinalis* [Borretsch], Brunnera orientalis, Cerinthe minor, Cynoglossum amabile, Cynoglossum lanceolatum, Echium rubrum, Echium vulgare, Gastrocatyle hispida, Lithospermum arvense,  
 40 Lithospermum purpureocaeruleum, Moltkia aurea, Moltkia coerules, Nonea macrosperra, Onosma sericeum, Onosmodium molle, Onosmodium occidentale, Paracaryum caelestinum, Pectocarya platycarpa, Symphytum officinale, Brassicaceae wie die Gattungen Brassica, Camelina, Melanosinapis, Sinapis, Arabadopsis z.B. die Gattun-

- gen und Arten *Brassica alba*, *Brassica carinata*, *Brassica hirta*, *Brassica napus*, *Brassica rapa* ssp. [Raps], *Sinapis arvensis* *Brassica juncea*, *Brassica juncea* var. *juncea*, *Brassica juncea* var. *crispifolia*, *Brassica juncea* var. *foliosa*, *Brassica nigra*, *Brassica sinapioides*, *Camelina sativa*, *Melanosinapis communis* [Senf], *Brassica oleracea* [Futterrübe] oder *Arabidopsis thaliana*, Bromeliaceae wie die Gattungen *Anana*, *Bromelia* (*Ananas*) z.B. die Gattungen und Arten *Anana comosus*, *Ananas ananas* oder *Bromelia comosa* [Ananas], Caricaceae wie die Gattung *Carica* wie die Gattung und Art *Carica papaya* [Papaya], Cannabaceae wie die Gattung *Cannabis* wie die Gattung und Art *Cannabis sativa* [Hanf], Convolvulaceae wie die Gattungen *Ipomea*, *Convolvulus* z.B. die Gattungen und Arten *Ipomea batatas*, *Ipomea pandurata*, *Convolvulus batatas*, *Convolvulus tiliaceus*, *Ipomea fastigiata*, *Ipomea tiliacea*, *Ipomea triloba* oder *Convolvulus panduratus* [Süßkartoffel, Batate], Chenopodiaceae wie die Gattung *Beta* wie die Gattungen und Arten *Beta vulgaris*, *Beta vulgaris* var. *altissima*, *Beta vulgaris* var. *Vulgaris*, *Beta maritima*, *Beta vulgaris* var. *perennis*, *Beta vulgaris* var. *conditiva* oder *Beta vulgaris* var. *esculenta* [Zuckerrübe], Cryptecodiniaceae wie die Gattung *Cryptecodinium* z.B. die Gattung und Art *Cryptecodinium cohnii*, Cucurbitaceae wie die Gattung *Cucurbita* z.B. die Gattungen und Arten *Cucurbita maxima*, *Cucurbita mixta*, *Cucurbita pepo* oder *Cucurbita moschata* [Kürbis], Elaeagnaceae wie die Gattung *Elaeagnus* z.B. die Gattung und Art *Olea europaea* [Olive], Ericaceae wie die Gattung *Kalmia* z.B. die Gattungen und Arten *Kalmia latifolia*, *Kalmia angustifolia*, *Kalmia microphylla*, *Kalmia polifolia*, *Kalmia occidentalis*, *Cistus chamaerhodendros* oder *Kalmia lucida* [Berglorbeer], Euphorbiaceae wie die Gattungen *Manihot*, *Janipha*, *Jatropha*, *Ricinus* z.B. die Gattungen und Arten *Manihot utilissima*, *Janipha manihot*, *Jatropha manihot*, *Manihot aipil*, *Manihot dulcis*, *Manihot manihot*, *Manihot melanobasis*, *Manihot esculenta* [Manihot] oder *Ricinus communis* [Rizinus], Fabaceae wie die Gattungen *Pisum*, *Albizia*, *Cathormion*, *Feuillea*, *Inga*, *Pithecolobium*, *Acacia*, *Mimosa*, *Medicago*, *Glycine*, *Dolichos*, *Phaseolus*, *Soja* z.B. die Gattungen und Arten *Pisum sativum*, *Pisum arvense*, *Pisum humile* [Erbse], *Albizia berteriana*, *Albizia julibrissin*, *Albizia lebbeck*, *Acacia berteriana*, *Acacia littoralis*, *Albizia berteriana*, *Albizia berteriana*, *Cathormion berteriana*, *Feuillea berteriana*, *Inga fragrans*, *Pithecellobium berterianum*, *Pithecellobium fragrans*, *Pithecolobium berterianum*, *Pseudalbizia berteriana*, *Acacia julibrissin*, *Acacia nemu*, *Albizia nemu*, *Feuillea julibrissin*, *Mimosa julibrissin*, *Mimosa speciosa*, *Sericanrda julibrissin*, *Acacia lebbeck*, *Acacia macrophylla*, *Albizia lebbeck*, *Feuillea lebbeck*, *Mimosa lebbeck*, *Mimosa speciosa* [Seidenbaum], *Medicago sativa*, *Medicago falcata*, *Medicago varia* [Alfalfa] *Glycine max*, *Dolichos soja*, *Glycine gracilis*, *Glycine hispida*, *Phaseolus max*, *Soja hispida* oder *Soja max* [Sojabohne], Geraniaceae wie die Gattungen *Pelargonium*, *Cocos*, *Oleum* z.B. die Gattungen und Arten *Cocos nucifera*, *Pelargonium grossularioides* oder *Oleum cocois* [Kokusnuss], Gramineae wie die Gattung *Saccharum* z.B. die Gattung und Art *Saccharum officinarum*, Juglandaceae wie die Gattungen *Juglans*, *Wallia* z.B. die Gattungen und Arten *Juglans regia*, *Juglans ailanthifolia*, *Juglans sieboldiana*, *Juglans cinerea*, *Wallia cinerea*, *Juglans bixbyi*, *Juglans californica*, *Juglans hindsii*, *Juglans intermedia*, *Juglans jamaicensis*, *Juglans major*, *Juglans microcarpa*, *Juglans nigra* oder *Wallia nigra* [Walnuss], Lauraceae Wie die Gattungen *Persea*, *Laurus* z.B. die Gattungen und Arten *Laurus nobilis* [Lorbeer],

- Persea americana*, *Persea gratissima* oder *Persea persea* [Avocado], Leguminosae wie die Gattung *Arachis* z.B. die Gattung und Art *Arachis hypogaea* [Erdnuss], Linaceae wie die Gattungen *Linum*, *Adenolinum* z.B. die Gattungen und Arten *Linum usitatissimum*, *Linum humile*, *Linum austriacum*, *Linum bienne*, *Linum angustifolium*,  
5 *Linum catharticum*, *Linum flavum*, *Linum grandiflorum*, *Adenolinum grandiflorum*, *Linum lewisii*, *Linum narbonense*, *Linum perenne*, *Linum perenne* var. *lewisii*, *Linum pratense* oder *Linum trigynum* [Lein], Lythraeae wie die Gattung *Punica* z.B. die Gattung und Art *Punica granatum* [Granatapfel], Malvaceae wie die Gattung *Gossypium* z.B. die Gattungen und Arten *Gossypium hirsutum*, *Gossypium arboreum*, *Gossypium barbadense*, *Gossypium herbaceum* oder *Gossypium thurberi* [Baumwolle],  
10 Marchantiaceae wie die Gattung *Marchantia* z.B. die Gattungen und Arten *Marchantia berteroana*, *Marchantia foliacea*, *Marchantia macropora*, Musaceae wie die Gattung *Musa* z.B. die Gattungen und Arten *Musa nana*, *Musa acuminata*, *Musa paradisiaca*, *Musa* spp. [Banane], Onagraceae wie die Gattungen *Camissonia*, *Oenothera* z.B. die Gattungen und Arten *Oenothera biennis*, *Oenothera grandiflora* oder *Camissonia brevipes* [Nachtkerze], Palmae wie die Gattung *Elaeis* z.B. die Gattung und Art *Elaeis guineensis* [Ölpalme], Papaveraceae wie die Gattung *Papaver* z.B. die Gattungen und Arten *Papaver orientale*, *Papaver rhoeas*, *Papaver dubium* [Mohn], Pedaliaceae wie die Gattung *Sesamum* z.B. die Gattung und Art *Sesamum indicum* [Sesam], Piperaceae wie die Gattungen *Piper*, *Artanthe*, *Peperomia*, *Steffensia* z.B. die Gattungen und  
20 Arten *Piper aduncum*, *Piper amalago*, *Piper angustifolium*, *Piper auritum*, *Piper betel*, *Piper cubeba*, *Piper longum*, *Piper nigrum*, *Piper retrofractum*, *Artanthe adunca*, *Artanthe elongata*, *Peperomia elongata*, *Piper elongatum*, *Steffensia elongata*. [Cayennepfeffer], Poaceae wie die Gattungen *Hordeum*, *Secale*, *Avena*, *Sorghum*,  
25 *Andropogon*, *Holcus*, *Panicum*, *Oryza*, *Zea* (Mais), *Triticum* z.B. die Gattungen und Arten *Hordeum vulgare*, *Hordeum jubatum*, *Hordeum murinum*, *Hordeum secalinum*, *Hordeum distichon*, *Hordeum aegiceras*, *Hordeum hexastichon*, *Hordeum hexastichum*, *Hordeum irregulare*, *Hordeum sativum*, *Hordeum secalinum* [Gerste], *Secale cereale* [Roggen], *Avena sativa*, *Avena fatua*, *Avena byzantina*, *Avena fatua* var. *sativa*, *Avena hybrida* [Hafer], *Sorghum bicolor*, *Sorghum halepense*, *Sorghum saccharatum*, *Sorghum vulgare*, *Andropogon drummondii*, *Holcus bicolor*, *Holcus sorghum*, *Sorghum aethiopicum*, *Sorghum arundinaceum*, *Sorghum caffrorum*,  
30 *Sorghum cernuum*, *Sorghum dochna*, *Sorghum drummondii*, *Sorghum durra*, *Sorghum guineense*, *Sorghum lanceolatum*, *Sorghum nervosum*, *Sorghum saccharatum*,  
35 *Sorghum subglabrescens*, *Sorghum verticilliflorum*, *Sorghum vulgare*, *Holcus halepensis*, *Sorghum miliaceum*, *Panicum militaceum* [Hirse], *Oryza sativa*, *Oryza latifolia* [Reis], *Zea mays* [Mais] *Triticum aestivum*, *Triticum durum*, *Triticum turgidum*, *Triticum hybernum*, *Triticum macha*, *Triticum sativum* oder *Triticum vulgare* [Weizen], Porphyridiaceae wie die Gattungen *Chrootheca*, *Flintiella*, *Petrovanella*, *Porphyridium*, *Rhodel-*  
40 *la*, *Rhodosorus*, *Vanhoeffenia* z.B. die Gattung und Art *Porphyridium cruentum*, Proteaceae wie die Gattung *Macadamia* z.B. die Gattung und Art *Macadamia integrifolia* [Macadamia], Rosaceae wie die Gattung *Prunus* z.B. die Gattung und Art *Prunus armeniaca*, *Prunus amygdalus*, *Prunus avium*, Rubiaceae wie die Gattung *Coffea* z.B. die Gattungen und Arten *Coffea* spp., *Coffea arabica*, *Coffea canephora* oder *Coffea liberica* [Kaffee], Scrophulariaceae wie die Gattung *Scrophularia*, *Verbascum* z.B. die



- Gattungen und Arten *Scrophularia marilandica*, *Verbascum blattaria*, *Verbascum chaixii*, *Verbascum densiflorum*, *Verbascum lagurus*, *Verbascum longifolium*, *Verbascum lychnitis*, *Verbascum nigrum*, *Verbascum olympicum*, *Verbascum phlomoides*, *Verbascum phoenicum*, *Verbascum pulverulentum* oder *Verbascum thapsus* [Königs-  
 5 kerze], Solanaceae wie die Gattungen *Capsicum*, *Nicotiana*, *Solanum*, *Lycopersicon* z.B. die Gattungen und Arten *Capsicum annuum*, *Capsicum annuum* var. *glabriusculum*, *Capsicum frutescens* [Pfeffer], *Capsicum annuum* [Paprika], *Nicotiana tabacum*, *Nicotiana alata*, *Nicotiana attenuata*, *Nicotiana glauca*, *Nicotiana langsdorffii*, *Nicotiana obtusifolia*, *Nicotiana quadrivalvis*, *Nicotiana repanda*, *Nicotiana rustica*, *Nicotiana*  
 10 *sylvestris* [Tabak], *Solanum tuberosum* [Kartoffel], *Solanum melongena* [Aubergine] *Lycopersicon esculentum*, *Lycopersicon lycopersicum*., *Lycopersicon pyriforme*, *Solanum integrifolium* oder *Solanum lycopersicum* [Tomate], Sterculiaceae wie die Gattung *Theobroma* z.B. die Gattung und Art *Theobroma cacao* [Kakao] oder Theaceae wie die Gattung *Camellia* z.B. die Gattung und Art *Camellia sinensis* [Tee]. Als  
 15 weitere Pflanzen seien die Gattung und Art *Argania spinosa*, *Arnebia griffithii*, *Adansonia digitata*, *Orbignya martiana*, *Carum carvi*, *Bertholletia excelsa*, *Aleurites moluccana*, *Hydnocarpus kurzii*, *Salvia hispanica*, *Vitis vinifera*, *Corvulus avellana*, *Humulus lupulus*, *Hyptis spicigera* und *Shorea stenoptera* genannt.

- Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren transgene Pflanzen wie zwei-  
 20 keimblättrige oder einkeimblättrige Pflanzen verwendet. Besonders vorteilhaft werden transgene Pflanzen im erfindungsgemäßen Verfahren verwendet, die zu den Ölproduzierenden Pflanzen gehören, das heißt die für die Herstellung von Ölen verwendet werden, wie bevorzugt Ölfruchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Saflor (*Carthamus tinctoria*),  
 25 Mohn, Senf, Hanf, Rizinus, Olive, Sesam, Calendula, Punica, Nachtkerze, Königskerze, Distel, Wildrosen, Haselnuss, Mandel, Macadamia, Avocado, Lorbeer, Kürbis, Lein, Soja, Pistazien, Borretsch, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss oder Walnuss) oder Feldfrüchte, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate,  
 30 Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa oder Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte.

- Bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölsamen- oder Ölfruchtpflanzen, wie Erdnuss, Raps, Canola, Sonnenblume, Saflor, Mohn, Saeptasenf, Senf, Hanf, Rhizinus, Olive, Calendula, Punica, Nachtkerze, Kürbis, Lein, Soja, Borretsch, Bäume  
 35 (Ölpalme, Kokosnuss). Besonders bevorzugt sind C18:2- und/oder C18:3-Fettsäure reiche Pflanzen wie Sonnenblume, Färberdistel, Tabak, Königskerze, Sesam, Baumwolle, Kürbis, Mohn, Nachtkerze, Walnuss, Lein, Hanf, Distel oder Färberdistel. Ganz besonders bevorzugt sind Pflanzen wie Färberdistel, Sonnenblume, Mohn, Nachtkerze, Walnuss, Lein, Saeptasenf, Camelina oder Hanf.
- 40 Für die erfindungsgemäßen beschriebenen Verfahren ist es vorteilhaft in die Pflanze zusätzlich zu den unter Verfahrensschritt (a) bis (e) bzw. (a) bis (c) eingebrachten Nukleinsäuren sowie den ggf. eingebrachten Nukleinsäuresequenzen, die für die  $\omega$ -3-

Desaturasasen und/oder die für die  $\Delta$ -12-Desaturasasen codieren, zusätzlich weitere Nukleinsäuren einzubringen, die für Enzyme des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels codieren.

Im Prinzip können alle Gene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels vorteilhaft in Kombination mit der(den) erfinderischen  $\Delta$ -5-Elongase(n),  $\Delta$ -6-Elongase(n) und/oder  $\omega$ -3-Desaturase(n) [im Sinne dieser Anmeldung soll der Plural den Singular und umgekehrt beinhalten] im Verfahren zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren verwendet werden vorteilhaft werden Gene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen, Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) in Kombination mit der  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -6-Elongase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase verwendet. Besonders bevorzugt werden Gene ausgewählt aus der Gruppe der  $\Delta$ -4-Desaturasasen,  $\Delta$ -5-Desaturasasen,  $\Delta$ -6-Desaturasasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Desaturasasen,  $\Delta$ -12-Desaturasasen,  $\Delta$ -6-Elongasen oder  $\Delta$ -9-Elongasen in Kombination mit den vorgenannten Genen für die  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -6-Elongase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase verwendet, wobei einzelne Gene oder mehrere Gene in Kombination verwendet werden können. Vorteilhaft werden die vorgenannten Genen in Kombination mit der erfindungsgemäß verwendeten  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase und/oder  $\Delta$ -12-Desaturase verwendet

Besonders bevorzugt werden Gene ausgewählt aus der Gruppe der  $\Delta$ -8-Desaturasasen,  $\Delta$ -9-Desaturasasen,  $\Delta$ -5-Elongase oder  $\Delta$ -9-Elongasen in Kombination mit den vorgenannten Genen verwendet.

Durch die enzymatische Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase- und/oder  $\Delta$ -12-Desaturaseaktivität kodieren, vorteilhaft in Kombination mit Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels wie Polypeptide mit  $\Delta$ -8-Desaturase- oder  $\Delta$ -5- oder  $\Delta$ -9-Elongaseaktivität kodieren, können im erfindungsgemäßen Verfahren unterschiedlichste mehrfach ungesättigte Fettsäuren hergestellt werden. Je nach Auswahl der für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Pflanzen lassen sich Mischungen der verschiedenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder einzelne mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie EPA oder ARA in freier oder gebundener Form herstellen. Je nachdem welche Fettsäuresammensetzung in der Ausgangspflanze vorherrscht (C18:2- oder C18:3-Fettsäuren) entstehen so Fettsäuren, die sich von C18:2-Fettsäuren ableiten, wie GLA, DGLA oder ARA, oder Fettsäuren, die sich von C18:3-Fettsäuren ableiten, wie SDA, ETA oder EPA. Liegt in der für das Verfahren verwendeten Pflanze als ungesättigte Fettsäure nur Linolsäure (= LA, C18:2 <sup>$\Delta$ 9,12</sup>) vor, so können als Produkte des Verfahrens nur GLA, DGLA und ARA entstehen, die als freie Fettsäuren oder gebunden vorliegen können.

Ist in der im Verfahren verwendeten Pflanze als ungesättigte Fettsäure nur  $\alpha$ -Linolensäure (= ALA, C18:3 <sup>$\Delta$ 9,12,15</sup>) vorhanden, wie beispielsweise in Lein, so können als Produkte des Verfahrens nur SDA, ETA oder EPA entstehen, die wie oben beschrieben als freie Fettsäuren oder gebunden vorliegen können.

- 5 Durch die Aktivität der  $\Delta$ -6-Desaturase und  $\Delta$ -6-Elongase entstehen beispielsweise GLA und DGLA bzw. SDA und ETA, je nach Ausgangspflanze und darin enthaltener ungesättigter Fettsäure. Bevorzugt entstehen DGLA bzw. ETA oder Mischungen
- 10 daraus. Wird zusätzlich die  $\Delta$ -5-Desaturase in die Pflanze eingebracht, so entstehen auch ARA und/oder EPA. Werden darüber hinaus noch Gene eingebracht, die für eine  $\Delta$ -5-Elongase- und/oder  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität codieren, so lassen sich die Fettsäuren DPA und/oder DHA im erfindungsgemäßen Verfahren herstellen. Vorteilhaft werden nur ARA, EPA und/oder DHA oder eine Mischung davon synthetisiert, abhängig von der in der Pflanze vorliegenden Fettsäure, die als Ausgangssubstanz für die
- 15 Synthese dient. Da es sich um Biosyntheseketten handelt, liegen die jeweiligen Endprodukte nicht als Reinsubstanzen in den Organismen vor. Es sind immer auch geringe Mengen der Vorläuferverbindungen im Endprodukt enthalten. Diese geringen Mengen betragen weniger als 20 Gew.-%, bevorzugt weniger als 15 Gew.-%, besonders bevorzugt weniger als 10 Gew.-%, am meisten bevorzugt weniger als 5, 4, 3, 2 oder 1 Gew.-%, bezogen auf die Endprodukte DGLA, ETA oder deren Mischungen
- 20 bzw. ARA, EPA oder deren Mischungen bzw. ARA, EPA, DHA oder deren Mischungen.

- Neben der Produktion der Ausgangsfettsäuren für die erfindungsgemäß verwendeten Enzyme direkt in der Pflanze können die Fettsäuren auch von außen gefüttert werden. Aus Kostengründen ist die Produktion in der Pflanze bevorzugt. Bevorzugte Substrate
- 25 für die Produktion von ARA sind die Linolsäure (C18:2 <sup>$\Delta$ 9,12</sup>), die  $\gamma$ -Linolensäure (C18:3 <sup>$\Delta$ 6,9,12</sup>) und die Dihomo- $\gamma$ -linolensäure (C20:3 <sup>$\Delta$ 8,11,14</sup>). Bevorzugte Substrate für die Produktion von EPA sind die Linolensäure (C18:3 <sup>$\Delta$ 9,12,15</sup>), die Stearidonsäure (C18:4 <sup>$\Delta$ 6,9,12,15</sup>) und die Eicosatetraensäure (C20:4 <sup>$\Delta$ 8,11,14,17</sup>). Bevorzugte Substrate für die Produktion von DHA sind die Linolensäure (C18:3 <sup>$\Delta$ 9,12,15</sup>), die Stearidonsäure
- 30 (C18:4 <sup>$\Delta$ 6,9,12,15</sup>), die Eicosatetraensäure (C20:4 <sup>$\Delta$ 8,11,14,17</sup>), EPA und DPA.

- Die erfindungsgemäßen  $\Delta$ -5-Elongasen haben gegenüber den humanen Elongasen oder Elongasen aus nicht-humanen Tieren wie denen aus *Oncorhynchus*, *Xenopus* oder *Ciona* die vorteilhafte Eigenschaft, dass sie C<sub>22</sub>-Fettsäuren nicht zu den entsprechenden C<sub>24</sub>-Fettsäuren elongieren. Weiterhin setzen sie vorteilhaft keine Fettsäuren
- 35 mit einer Doppelbindung in  $\Delta$ -6-Position um, wie sie von den humanen Elongasen oder den Elongasen aus nicht-humanen Tieren umgesetzt werden. Besonders vorteilhafte  $\Delta$ -5-Elongasen setzen bevorzugt nur ungesättigte C<sub>20</sub>-Fettsäuren um. Diese vorteilhaften  $\Delta$ -5-Elongasen weisen einige putative Transmembran-Helices (5 – 7) auf. Vorteilhaft werden nur C<sub>20</sub>-Fettsäuren mit einer Doppelbindung in  $\Delta$ -5-Position umgesetzt,
- 40 wobei  $\omega$ -3-C<sub>20</sub> Fettsäuren bevorzugt werden (EPA). Weiterhin haben sie in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die Eigenschaft, dass sie neben der  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität vorteilhaft keine oder nur eine relativ geringe  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität

aufweisen. Im Gegensatz dazu weisen die humanen Elongasen oder nicht-humanen Tier-Elongasen eine annähernd gleiche Aktivität gegenüber Fettsäuren mit einer  $\Delta$ -6- oder  $\Delta$ -5-Doppelbindung auf. Diese vorteilhaften Elongasen werden als sogenannte monofunktionelle Elongasen bezeichnet. Die humanen Elongasen oder die nicht-humanen Tierelongasen werden dem gegenüber als multifunktionelle Elongasen bezeichnet, die neben den vorgenannten Substraten auch monounsättigte C<sub>16</sub>- und C<sub>18</sub>-Fettsäuren beispielsweise mit  $\Delta$ -9- oder  $\Delta$ -11-Doppelbindung umsetzen. Vorteilhaft setzen die monofunktionellen Elongasen in einem Hefefütterungstext, in dem als Substrat EPA den Hefen zugesetzt wurde, mindestens 15 Gew.-% des zugesetzten EPAs zu Docosapentaensäure (DPA, C22:5 <sup>$\Delta$ 7,10,13,16,19</sup>), vorteilhaft mindestens 20 Gew.-%, besonders vorteilhaft mindestens 25 Gew.-% um. Wird als Substrat  $\gamma$ -Linolensäure (= GLA, C18:3 <sup>$\Delta$ 6,9,12</sup>) gegeben, so wird diese vorteilhaft gar nicht elongiert. Ebenfalls wird auch C18:3 <sup>$\Delta$ 5,9,12</sup> nicht elongiert. In einer anderen vorteilhaften Ausführungsform werden weniger als 60 Gew.-% des zugesetzten GLA zu Dihomo- $\gamma$ -linolensäure (= C20:3 <sup>$\Delta$ 8,11,14</sup>) umgesetzt, vorteilhaft weniger als 55 Gew.-%, bevorzugt weniger als 50 Gew.-%, besonders vorteilhaft weniger als 45 Gew.-%, ganz besonders vorteilhaft weniger als 40 Gew.-%. In einer weiteren ganz bevorzugten Ausführungsform der erfindungsgemäßen  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität wird GLA nicht umgesetzt.

Die Figuren 27 und 28 geben die gemessenen Substratspezifitäten der verschiedenen Elongasen wieder. In Figur 27 sind die Spezifitäten der multifunktionellen Elongasen von *Xenopus laevis* (Fig. 27 A), *Ciona intestinalis* (Fig. 27 B) und *Oncorhynchus mykiss* (Fig. 27 C) wiedergegeben. Alle diese Elongasen setzen ein breites Spektrum an Substraten um. Dies kann im erfindungsgemäßen Verfahren zu Nebenprodukten führen, die durch weitere enzymatische Aktivitäten umgesetzt werden müssen. Diese Enzyme sind deshalb im erfindungsgemäßen Verfahren weniger bevorzugt. Die bevorzugten monofunktionellen Elongasen und ihre Substratspezifität werden in Figur 28 wiedergegeben. Figur 28 A zeigt die Spezifität der *Ostreococcus tauri*  $\Delta$ -5-Elongase. Dies setzt nur Fettsäuren mit einer Doppelbindung in  $\Delta$ -5-Position um. Vorteilhaft werden nur C20-Fettsäuren umgesetzt. Eine ähnlich hohe Substratspezifität weist die  $\Delta$ -5-Elongase von *Thalassiosira pseudonana* (Fig. 28. C) auf. Sowohl die  $\Delta$ -6-Elongase von *Ostreococcus tauri* (Fig. 28 B) als auch die von *Thalassiosira pseudonana* (Fig. 28 D) setzen vorteilhaft nur Fettsäuren mit einer Doppelbindung in  $\Delta$ -6-Position um. Vorteilhaft werden nur C18-Fettsäuren umgesetzt. Auch die  $\Delta$ -5-Elongasen aus *Arabidopsis thaliana* und *Euglena gracilis* zeichnen sich durch ihre Spezifität aus.

Vorteilhafte erfindungsgemäße  $\Delta$ -6-Elongasen zeichnen sich ebenfalls durch eine hohe Spezifität aus, das heißt bevorzugt werden C<sub>18</sub>-Fettsäuren elongiert. Vorteilhaft setzen sie Fettsäuren mit einer Doppelbindung in  $\Delta$ -6-Position um. Besonders vorteilhafte  $\Delta$ -6-Elongasen setzen vorteilhaft C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit drei oder vier Doppelbindungen im Molekül um, wobei diese eine Doppelbindung in  $\Delta$ -6-Position enthalten müssen. Weiterhin haben sie in einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung die Eigenschaft, dass sie neben der  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität vorteilhaft keine oder nur eine relativ geringe  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität aufweisen. Im Gegensatz dazu weisen die humanen Elongasen oder nicht-humanen Tier-Elongasen eine annähernd gleiche Aktivität

gegenüber Fettsäuren mit einer  $\Delta$ -6- oder  $\Delta$ -5-Doppelbindung auf. Diese vorteilhaften Elongasen werden als sogenannte monofunktionelle Elongasen bezeichnet. Die humanen Elongasen oder die nicht-humanen Tierelongasen werden, wie oben beschrieben, dem gegenüber als multifunktionelle Elongasen bezeichnet, die neben

5 den vorgenannten Substraten auch monoungesättigte  $C_{16}$ - und  $C_{18}$ -Fettsäuren beispielsweise mit  $\Delta$ -9- oder  $\Delta$ -11-Doppelbindung umsetzen. Vorteilhaft setzen die monofunktionellen Elongasen in einem Hefefütterungstext, in dem als Substrat EPA den Hefen zugesetzt wurde, mindestens 10 Gew.-% der zugesetzten  $\alpha$ -Linolensäure (= ALA,  $C_{18:3}^{\Delta 9,12,15}$ ) bzw. mindestens 40 Gew.-% der zugesetzten  $\gamma$ -Linolensäure (=

10 GLA,  $C_{18:3}^{\Delta 6,9,12}$ ), vorteilhaft mindestens 20 Gew.-% bzw. 50 Gew.-%, besonders vorteilhaft mindestens 25 Gew.-% bzw. 60 Gew.-% um. Besonders vorteilhaft wird auch  $C_{18:4}^{\Delta 6,9,12,15}$  (Stearidonsäure) elongiert. SDA wird dabei zu mindestens 40 Gew.-%, vorteilhaft zu mindestens 50 Gew.-%, besonders vorteilhaft zu mindestens 60 Gew.-%, ganz besonders vorteilhaft zu mindestens 70 Gew.-% umgesetzt. Besonders

15 vorteilhafte  $\Delta$ -6-Elongasen zeigen keine oder nur eine sehr geringe Aktivität (weniger als 0,1 Gew.-% Umsatz) gegenüber den folgenden Substraten:  $C_{18:1}^{\Delta 6}$ ,  $C_{18:1}^{\Delta 9}$ ,  $C_{18:1}^{\Delta 11}$ ,  $C_{20:2}^{\Delta 11,14}$ ,  $C_{20:3}^{\Delta 11,14,17}$ ,  $C_{20:3}^{\Delta 8,11,14}$ ,  $C_{20:4}^{\Delta 5,8,11,14}$ ,  $C_{20:5}^{\Delta 5,8,11,14,17}$  oder  $C_{22:4}^{\Delta 7,10,13,16}$ .

Die Figuren 29 und 30 sowie die Tabelle 21 gibt die gemessenen Substratspezifitäten der verschiedenen Elongasen wieder.

20

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete  $\omega$ -3-Desaturase hat gegenüber den bekannten  $\omega$ -3-Desaturase die vorteilhafte Eigenschaft, dass sie ein breites Spektrum an  $\omega$ -6-Fettsäuren desaturieren kann, bevorzugt werden  $C_{20}$ - und  $C_{22}$ -Fettsäuren wie  $C_{20:2}$ ,  $C_{20:3}$ ,  $C_{20:4}$ ,  $C_{22:4}$  oder  $C_{22:5}$ -Fettsäuren desaturiert. Aber auch die kürzeren  $C_{18}$ -

25 Fettsäuren wie  $C_{18:2}$  oder  $C_{18:3}$ -Fettsäuren werden vorteilhaft desaturiert. Durch diese Eigenschaften der  $\omega$ -3-Desaturase ist es vorteilhaft möglich das Fettsäurespektrum innerhalb eines Organismus vorteilhaft innerhalb einer Pflanze oder einem Pilz von den  $\omega$ -6-Fettsäuren zu den  $\omega$ -3-Fettsäuren hin zu verschieben. Bevorzugt werden von der erfindungsgemäßen  $\omega$ -3-Desaturase  $C_{20}$ -Fettsäuren desaturiert. Innerhalb des

30 Organismus werden diese Fettsäuren aus dem vorhandenen Fettsäurepool zu mindestens 10%, 15%, 20%, 25% oder 30% zu den entsprechenden  $\omega$ -3-Fettsäuren umgesetzt. Gegenüber den  $C_{18}$ -Fettsäuren weist die  $\omega$ -3-Desaturase eine um den Faktor 10 geringere Aktivität auf, das heißt es werden nur ca. 1,5 bis 3% der im Fettsäurepool vorhandenen Fettsäuren zu den entsprechenden  $\omega$ -3-Fettsäuren

35 umgesetzt. Bevorzugtes Substrat der erfindungsgemäßen  $\omega$ -3-Desaturase sind die in Phospholipiden gebundenen  $\omega$ -6-Fettsäuren. Figur 19 zeigt deutlich am Beispiel der Desaturierung von Dihomo- $\gamma$ -linolensäure [ $C_{20:4}^{\Delta 8,11,14}$ ], dass die  $\omega$ -3-Desaturase bei der Desaturierung vorteilhaft nicht zwischen an sn1- oder sn2-Position gebundenen Fettsäuren unterscheidet. Sowohl an sn1- oder sn2-Position in den Phospholipide

40 gebundene Fettsäuren werden desaturiert. Weiterhin ist vorteilhaft, dass die  $\omega$ -3-Desaturase eine breite Palette von Phospholipiden wie Phosphatidylcholin (= PC), Phosphatidylinositol (= PIS) oder Phosphatidylethanolamin (= PE) umsetzt. Schließlich

lassen sich auch Desaturierungsprodukte in den Neutrallipiden (= NL), das heißt in den Triglyceriden finden.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten  $\Delta$ -4-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen und  $\Delta$ -6-Desaturasen haben gegenüber den bekannten  $\Delta$ -4-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen und  $\Delta$ -6-Desaturasen den Vorteil, dass sie Fettsäuren gebunden an Phospholipide oder CoA-Fettsäureester, vorteilhaft CoA-Fettsäureester umsetzen können.

Vorteilhaft setzen die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturasen Ölsäure (C18:1 <sup>$\Delta$ 9</sup>) zu Linolsäure (C18:2 <sup>$\Delta$ 9,12</sup>) oder C18:2 <sup>$\Delta$ 6,9</sup> zu C18:3 <sup>$\Delta$ 6,9,12</sup> (= GLA) um. Vorteilhaft setzen die verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturasen Fettsäuren gebunden an Phospholipide oder CoA-Fettsäureester, vorteilhaft gebunden an CoA-Fettsäureester um.

Durch die enzymatische Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität codieren, vorteilhaft in Kombination mit Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels wie weiteren Polypeptiden mit  $\Delta$ -4-,  $\Delta$ -5-,  $\Delta$ -6-,  $\Delta$ -8-,  $\Delta$ -12-Desaturase- oder  $\Delta$ -5-,  $\Delta$ -6- oder  $\Delta$ -9-Elongaseaktivität codieren, können unterschiedlichste mehrfach ungesättigte Fettsäuren im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt werden. Je nach Auswahl der für das erfindungsgemäße Verfahren verwendeten vorteilhaften Pflanze lassen sich Mischungen der verschiedenen mehrfach ungesättigten Fettsäuren oder einzelne mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie EPA, ARA oder DHA in freier oder gebundener Form herstellen. Je nachdem welche Fettsäurezusammensetzung in der Ausgangspflanze vorherrscht (C18:2- oder C18:3-Fettsäuren) entstehen so Fettsäuren, die sich von C18:2-Fettsäuren ableiten, wie GLA, DGLA oder ARA oder, die sich von C18:3-Fettsäuren ableiten, wie SDA, ETA, EPA oder DHA. Liegt in der für das Verfahren verwendeten Pflanze als ungesättigte Fettsäure nur Linolsäure (= LA, C18:2 <sup>$\Delta$ 9,12</sup>) vor, so können als Produkte des Verfahrens nur GLA, DGLA und ARA entstehen, die als freie Fettsäuren oder gebunden vorliegen können. Durch Expression der zusätzlichen  $\omega$ -3-Desaturase in diesen Pflanzen kann das Fettsäurespektrum auch hin zu  $\alpha$ -Linolensäure, DPA und DHA hin verschoben werden. Allerdings ist diese Verschiebung des Fettsäurespektrums nur relativ eingeschränkt möglich. Vorteilhafter ist eine solche Verschiebung in Pflanzen, die, wie im folgenden beschrieben, schon einen hohen Anteil an  $\alpha$ -Linolensäure enthalten. Ist in der im Verfahren verwendeten Pflanze als ungesättigte Fettsäure nur  $\alpha$ -Linolensäure (= ALA, C18:3 <sup>$\Delta$ 9,12,15</sup>) beispielsweise wie in Lein, so können als Produkte des Verfahrens nur SDA, ETA, EPA und/oder DHA entstehen, die wie oben beschrieben als freie Fettsäuren oder gebunden vorliegen können. Durch Modifikation der Aktivität des an der Synthese beteiligten Enzyms  $\Delta$ -5-Elongase vorteilhaft in Kombination mit der  $\Delta$ -4-,  $\Delta$ -5-,  $\Delta$ -6-,  $\Delta$ -12-Desaturase und/oder  $\Delta$ -6-Elongase, oder der  $\Delta$ -4-,  $\Delta$ -5-,  $\Delta$ -8-,  $\Delta$ -12-Desaturase, und/oder  $\Delta$ -9-Elongase lassen sich gezielt in den vorgenannten Pflanzen nur einzelne Produkte herstellen. Durch die Aktivität der  $\Delta$ -6-Desaturase und  $\Delta$ -6-Elongase entstehen

beispielsweise GLA und DGLA bzw. SDA und ETA, je nach Ausgangspflanze und ungesättigter Fettsäure. Bevorzugt entstehen DGLA bzw. ETA oder deren Mischungen. Werden die  $\Delta$ -5-Desaturase, die  $\Delta$ -5-Elongase und die  $\Delta$ -4-Desaturase zusätzlich in die Organismen vorteilhaft in die Pflanze eingebracht, so entstehen zusätzlich ARA, EPA und/oder DHA. Dies gilt auch für Organismen in die vorher die  $\Delta$ -8-Desaturase und  $\Delta$ -9-Elongase eingebracht wurde. Vorteilhaft werden nur ARA, EPA oder DHA oder deren Mischungen synthetisiert, abhängig von der in der Pflanze vorliegenden Fettsäure, die als Ausgangssubstanz für die Synthese dient. Da es sich um Biosyntheseketten handelt, liegen die jeweiligen Endprodukte nicht als Reinsubstanzen in den Organismen vor. Es sind immer auch geringe Mengen der Vorläuferverbindungen im Endprodukt enthalten. Diese geringen Mengen betragen weniger als 20 Gew.-%, vorteilhaft weniger als 15 Gew.-%, besonders vorteilhaft weniger als 10 Gew.-%, ganz besonders vorteilhaft weniger als 5, 4, 3, 2 oder 1 Gew.-% bezogen auf das Endprodukt DGLA, ETA oder deren Mischungen bzw. ARA, EPA, DHA oder deren Mischungen vorteilhaft EPA oder DHA oder deren Mischungen.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendbare aus Forelle stammende Nukleinsäure mit der SEQ ID NO: 53 kodiert für ein Protein, das eine hohe Spezifität für die beiden C18:4 <sup>$\Delta$ 6,9,12,15</sup>- und C20:5 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14,17</sup>-Fettsäuren zeigt, diese sind Vorstufen zur Synthese von DHA (Vorstufen und Synthese von DHA siehe Figur 1). Aber auch andere Fettsäuren werden durch das Enzym elongiert. Das von SEQ NO: 53 kodierte Protein hat damit eine Spezifität für  $\Delta$ 6- und  $\Delta$ 5-Fettsäuren mit zusätzlich einer  $\omega$ 3-Doppelbindung (Figur 2). Die  $\Delta$ -5-Elongase hat eine keto-Acyl-CoA-Synthase-Aktivität, die vorteilhaft Fettsäurereste von Acyl-CoA-Estern um 2 Kohlenstoffatome verlängert.

Durch das Genprodukt des vorgenannten Fisch- $\Delta$ -5-Elongase-Gens und weiterer  $\Delta$ -5-Elongasen, der  $\Delta$ 5-Desaturase aus *Phaeodacylum* sowie der  $\Delta$ 4-Desaturase aus *Euglena* konnte die Synthese von DHA in Hefe (*Saccharomyces cerevisiae*) nachgewiesen werden (Figur 3).

Neben der Produktion der Ausgangsfettsäuren für die im erfindungsgemäßen Verfahren vorteilhaft verwendeten  $\Delta$ -5-Elongasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -9-Elongasen,  $\Delta$ -4-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -12-Desaturasen und/oder  $\omega$ -3-Desaturasen direkt im transgenen Organismus vorteilhaft in der transgenen Pflanze können die Fettsäuren auch von außen gefüttert werden. Aus Kostengründen ist die Produktion im Organismus bevorzugt. Bevorzugt Substrate der  $\omega$ -3-Desaturase sind die Linolsäure (C18:2 <sup>$\Delta$ 9,12</sup>), die  $\gamma$ -Linolensäure (C18:3 <sup>$\Delta$ 6,9,12</sup>), die Eicosadiensäure (C20:2 <sup>$\Delta$ 11,14</sup>), die Dihomo- $\gamma$ -linolensäure (C20:3 <sup>$\Delta$ 8,11,14</sup>), die Arachidonsäure (C20:4 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14</sup>), die Docosatetraensäure (C22:4 <sup>$\Delta$ 7,10,13,16</sup>) und die Docosapentaensäure (C22:5 <sup>$\Delta$ 4,7,10,13,15</sup>).

Zur Steigerung der Ausbeute im beschriebenen Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder Triglyceriden mit einem vorteilhaft erhöhten Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren ist es vorteilhaft die Menge an Ausgangsprodukt für die Fettsäuresynthese zu steigern, dies kann beispielsweise durch das Einbringen einer Nukleinsäure in

- den Organismus, die für ein Polypeptid mit  $\Delta$ -12-Desaturase codiert, erreicht werden. Dies ist besonders vorteilhaft in Öl-produzierenden Organismen wie der Familie der Brassicaceae wie der Gattung Brassica z.B. Raps; der Familie der Elaeagnaceae wie die Gattung Elaeagnus z.B. die Gattung und Art *Olea europaea* oder der Familie Fabaceae wie der Gattung Glycine z.B. die Gattung und Art *Glycine max*, die einen hohen Ölsäuregehalt aufweisen. Da diese Organismen nur einen geringen Gehalt an Linolsäure aufweisen (Mikoklajczak et al., Journal of the American Oil Chemical Society, 38, 1961, 678 - 681) ist die Verwendung der genannten  $\Delta$ -12-Desaturasen zur Herstellung des Ausgangsprodukts Linolsäure vorteilhaft.
- 10 Im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren stammen vorteilhaft aus Pflanzen wie Algen beispielsweise Algen der Familie der Prasinophyceae wie aus den Gattungen Heteromastix, Mammella, Mantoniella, Micromonas, Nephroselmis, Ostreococcus, Prasinocladus, Prasinococcus, Pseudoscurfieldia, Pycnococcus, Pyramimonas, Scherffelia oder Tetraselmis wie den Gattungen und Arten Heteromastix longifillis, Mamiella gilva, Mantoniella squamata, Micromonas pusilla, Nephroselmis olivacea, Nephroselmis pyriformis, Nephroselmis rotunda, Ostreococcus tauri, Ostreococcus sp. Prasinocladus ascus, Prasinocladus lubricus, Pycnococcus provasolii, Pyramimonas amylifera, Pyramimonas disomata, Pyramimonas obovata, Pyramimonas orientalis, Pyramimonas parkeae, Pyramimonas spinifera, Pyramimonas sp., Tetraselmis apiculata, Tetraselmis carteriformis, Tetraselmis chui, Tetraselmis convolutae, Tetraselmis desikacharyi, Tetraselmis gracilis, Tetraselmis hazeni, Tetraselmis impellucida, Tetraselmis inconspicua, Tetraselmis levis, Tetraselmis maculata, Tetraselmis marina, Tetraselmis striata, Tetraselmis subcordiformis, Tetraselmis suecica, Tetraselmis tetrabrachia, Tetraselmis tetrathele, Tetraselmis verrucosa, Tetraselmis verrucosa fo. rubens oder Tetraselmis sp. oder aus Algen der Familie Euglenaceae wie aus den Gattungen Ascoglena, Astasia, Colacium, Cyclidiopsis, Euglena, Euglenopsis, Hyalophacus, Khawkinia, Lepocinclis, Phacus, Strombomonas oder Trachelomonas wie die Gattungen und Art Euglena acus, Euglena geniculata, Euglena gracilis, Euglena mixocylindracea, Euglena rostrifera, Euglena viridis, Colacium stentorium, Trachelomonas cylindrica oder Trachelomonas volvocina. Auch aus Algen wie der Alge Porphyridium cruentum, Isochrysis galbana oder Chlorella minutissima, Chlorella vulgaris, Thraustochytrium aureum oder Nannochloropsis oculata können vorteilhaft die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen stammen. Vorteilhaft stammen die verwendeten Nukleinsäuren aus Algen der Gattungen Euglena, Mantoniella oder Ostreococcus.

- Weitere vorteilhafte Pflanzen als Quellen für die im erfindungsgemäße Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen sind Algen wie Isochrysis oder Crypthecodinium, Algen/Diatomeen wie Thalassiosira oder Phaeodactylum, Moose wie Physcomitrella oder Ceratodon oder höheren Pflanzen wie den Primulaceae wie Aleuritia, Calendula stellata, Osteospermum spinescens oder Osteospermum hyoseroides, Mikroorganismen wie Pilzen wie Aspergillus, Thraustochytrium, Phytophthora, Entomophthora,



Mucor oder Mortierella, Bakterien wie Shewanella, Hefen oder Tieren wie Nematoden wie Caenorhabditis, Insekten, Fröschen, Seegurken oder Fischen. Vorteilhaft stammen die im erfindungsgemäßen Verfahren isolierten, verwendeten Nukleinsäuresequenzen aus einem Tier aus der Ordnung der Vertebraten. Bevorzugt stammen die Nukleinsäuresequenzen aus der Klasse der Vertebrata; Euteleostomi, Actinopterygii; Neopterygii; Teleostei; Euteleostei, Protacanthopterygii, Salmoniformes; Salmonidae bzw. Oncorhynchus oder Vertebrata, Amphibia, Anura, Pipidae, Xenopus oder Euteleostomi wie Protochordata, Tunicata, Holothuroidea, Cionidae wie Amaroucium constellatum, Botryllus schlosseri, Ciona intestinalis, Molgula citrina, Molgula manhattensis, Perophora viridis oder Styela partita. Besonders vorteilhaft stammen die Nukleinsäuren aus Pilzen, Tieren oder aus Pflanzen wie Algen oder Moosen, bevorzugt aus der Ordnung der Salmoniformes wie der Familie der Salmonidae wie der Gattung Salmo beispielsweise aus den Gattungen und Arten Oncorhynchus mykiss, Trutta trutta oder Salmo trutta fario, aus Algen wie den Gattungen Mantoniella oder Ostreococcus oder aus den Diatomeen wie den Gattungen Thalassiosira oder Phaeodactylum oder aus Algen wie Cryptothecodinium.

Auch aus Mikroorganismen wie Pilze wie der Gattung Mortierella, Phytium z.B. der Gattung und Art Mortierella alpina, Mortierella elongata, Phytium irregulare, Phytium ultimum oder Bakterien wie der Gattung Shewanella z.B. der Gattung und Art Shewanella hanedai können vorteilhafte im erfindungsgemäßen Verfahren verwendete Nukleinsäure stammen.

Vorteilhaft werden im erfindungsgemäßen Verfahren die vorgenannten Nukleinsäuresequenzen oder deren Derivat oder Homologe, die für Polypeptide codieren, die noch die enzymatische Aktivität der durch Nukleinsäuresequenzen codierten Proteine besitzen. Diese Sequenzen werden einzeln oder in Kombination mit den für die  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -6-Elongase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase codierenden Nukleinsäuresequenzen in Expressionskonstrukte cloniert und zum Einbringen und zur Expression in Organismen verwendet. Diese Expressionskonstrukte ermöglichen durch ihre Konstruktion eine vorteilhafte optimale Synthese der im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens einer transgenen Pflanze, die die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen enthält, wobei die Pflanze mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz, die für die  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -6-Elongase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase codiert, einem Genkonstrukt oder einem Vektor wie nachfolgend beschrieben, allein oder in Kombination mit weiteren Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels codieren, transformiert wird. Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens der Öle, Lipide oder freien Fettsäuren aus dem Samen der Pflanze wie aus dem Samen einer

Ölfruchtpflanze wie beispielsweise Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Hanf, Erdnuss, Soja, Safflower, Hanf, Sonnenblumen oder Borretsch.

- Unter Anzucht ist beispielsweise die Kultivierung im Falle von Pflanzenzellen, -gewebe oder -organe auf oder in einem Nährmedium oder der ganzen Pflanze auf bzw. in einem Substrat beispielsweise in Hydrokultur, Blumentopferde oder auf einem Ackerboden zu verstehen.

- Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind Genkonstrukte, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, die für eine  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase oder  $\Delta$ -6-Elongase codieren, enthalten, wobei die Nukleinsäure funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbunden ist. Zusätzlich können weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n) im Genkonstrukt enthalten sein. Vorteilhaft sind zusätzlich Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe der  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -9-Desaturase,  $\Delta$ -9-Elongase oder  $\omega$ -3-Desaturase enthalten.

- Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität kodieren, werden vorteilhaft allein oder bevorzugt in Kombination in einer Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt), die die Expression der Nukleinsäuren in einer Pflanze ermöglicht, in die Pflanze eingebracht. Es kann im Nukleinsäurekonstrukt mehr als eine Nukleinsäuresequenz einer enzymatischen Aktivität wie z.B. einer  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase und/oder  $\Delta$ -6-Elongase enthalten sein.

- Zum Einbringen der Nukleinsäuren in die Genkonstrukte werden die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren vorteilhaft einer Amplifikation und Ligation in bekannter Weise unterworfen. Vorzugsweise geht man in Anlehnung an das Protokoll der Pfu-DNA-Polymerase oder eines Pfu/Taq-DNA-Polymerasegemisches vor. Die Primer werden unter Berücksichtigung der zu amplifizierenden Sequenz ausgewählt. Zweckmäßigerweise sollten die Primer so gewählt werden, dass das Amplifikat die gesamte kodogene Sequenz vom Start- bis zum Stop-Kodon umfasst. Im Anschluss an die Amplifikation wird das Amplifikat zweckmäßigerweise analysiert. Beispielsweise kann nach gelelektrophoretischer Auftrennung eine quantitative und qualitative Analyse erfolgen. Im Anschluss kann das Amplifikat nach einem Standardprotokoll gereinigt werden (z.B. Qiagen). Ein Aliquot des gereinigten Amplifikats steht dann für die nachfolgende Klonierung zur Verfügung.

Geeignete Klonierungsvektoren sind dem Fachmann allgemein bekannt. Hierzu gehören insbesondere Vektoren, die in mikrobiellen Systemen replizierbar sind, also vor allem Vektoren, die eine effiziente Klonierung in Hefen oder Pilzen gewährleisten, und die die stabile Transformation von Pflanzen ermöglichen. Zu nennen sind insbesondere verschiedene für die T-DNA-vermittelte Transformation geeignete, binäre und co-integrierte Vektorsysteme. Derartige Vektorsysteme sind in der Regel dadurch gekennzeichnet, dass sie zumindest die für die Agrobakterium-vermittelte Transformation benötigten *vir*-Gene sowie die T-DNA begrenzenden Sequenzen (T-DNA-Border) beinhalten. Vorzugsweise umfassen diese Vektorsysteme auch weitere cis-regulatorische Regionen wie Promotoren und Terminatorsequenzen und/oder Selektionsmarker, mit denen entsprechend transformierte Organismen identifiziert werden können. Während bei co-integrierten Vektorsystemen *vir*-Gene und T-DNA-Sequenzen auf demselben Vektor angeordnet sind, basieren binäre Systeme auf wenigstens zwei Vektoren, von denen einer *vir*-Gene, aber keine T-DNA und ein zweiter T-DNA, jedoch kein *vir*-Gen trägt. Dadurch sind letztere Vektoren relativ klein, leicht zu manipulieren und sowohl in *E. coli* als auch in *Agrobacterium* zu replizieren. Zu diesen binären Vektoren gehören Vektoren der Serien pBIB-HYG, pPZP, pBecks, pGreen. Erfindungsgemäß werden bevorzugt Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV und pCAMBIA verwendet. Eine Übersicht über binäre Vektoren und ihre Verwendung gibt Hellens et al, Trends in Plant Science (2000) 5, 446–451.

Für die Vektorpräparation können die Vektoren zunächst mit Restriktionsendonuklease(n) linearisiert und dann in geeigneter Weise enzymatisch modifiziert werden. Im Anschluss wird der Vektor gereinigt und ein Aliquot für die Klonierung eingesetzt. Bei der Klonierung wird das enzymatisch geschnittene und erforderlichenfalls gereinigte Amplifikat mit ähnlich präparierten Vektorfragmenten unter Einsatz von Ligase verbunden. Dabei kann ein bestimmtes Nukleinsäurekonstrukt bzw. Vektor- oder Plasmidkonstrukt einen oder auch mehrere kodogene Genabschnitte aufweisen. Vorzugsweise sind die kodogenen Genabschnitte in diesen Konstrukten mit regulatorischen Sequenzen funktional verknüpft. Zu den regulatorischen Sequenzen gehören insbesondere pflanzliche Sequenzen wie Promotoren und Terminatorsequenzen. Die Konstrukte lassen sich vorteilhafterweise in Mikroorganismen, insbesondere in *E. coli* und *Agrobacterium tumefaciens*, unter Selektionsbedingungen stabil propagieren und ermöglichen einen Transfer von heterologer DNA in Pflanzen oder Mikroorganismen.

Unter der vorteilhaften Verwendung von Klonierungsvektoren können die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren in Pflanzen eingebracht werden und damit bei der Transformation von Pflanzen verwendet werden, wie denjenigen, die veröffentlicht und dort zitiert sind: Plant Molecular Biology and Biotechnology (CRC Press, Boca Raton, Florida), Kapitel 6/7, S. 71-119 (1993); F.F. White, Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, 15-38; B. Jenes et al., Techniques for Gene Transfer, in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-143; Potrykus, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol. 42 (1991), 205-225. Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren

und/oder Vektoren lassen sich damit zur gentechnologischen Veränderung eines breiten Spektrums an Pflanzen verwenden, so dass diese bessere und/oder effizientere Produzenten von PUFAs werden.

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die eine Veränderung des  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase- und/oder  $\Delta$ -6-Desaturase-Proteins möglich ist, so dass die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einer Pflanze, bevorzugt in einer Ölsamen- oder Ölfruchtpflanze, aufgrund dieses veränderten Proteins direkt beeinflusst werden kann. Die Anzahl oder Aktivität der  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase- oder  $\Delta$ -5-Desaturase-Proteine oder -Gene kann erhöht werden, so dass größere Mengen der Genprodukte und damit letztlich größere Mengen der Verbindungen der allgemeinen Formel I hergestellt werden. Auch eine de novo Synthese in einer Pflanze, der die Aktivität und Fähigkeit zur Biosynthese der Verbindungen vor dem Einbringen des/der entsprechenden Gens/Gene fehlte, ist möglich. Entsprechendes gilt für die Kombination mit weiteren Desaturasen oder Elongasen oder weiteren Enzymen aus dem Fettsäure- und Lipidstoffwechsel. Auch die Verwendung verschiedener divergenter, d.h. auf DNA-Sequenzebene unterschiedlicher Sequenzen kann dabei vorteilhaft sein bzw. die Verwendung von Promotoren, die eine andere zeitliche Genexpression z.B. abhängig vom Reifegrad eines Samens oder Öl-speichernden Gewebes ermöglichen.

Durch das Einbringen einer Kombination von  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase- und/oder  $\Delta$ -5-Desaturase-Genen in die Pflanze allein oder in Kombination mit anderen Genen kann nicht nur der Biosynthesefluss zum Endprodukt erhöht, sondern auch die entsprechende Triacylglycerin-Zusammensetzung erhöht oder de novo geschaffen werden. Ebenso kann die Anzahl oder Aktivität anderer Gene, die am Import von Nährstoffen, die zur Biosynthese einer oder mehrerer Fettsäuren, Ölen, polaren und/oder neutralen Lipiden nötig sind, erhöht sein, so dass die Konzentration dieser Vorläufer, Cofaktoren oder Zwischenverbindungen innerhalb der Zellen oder innerhalb des Speicherkompartiments erhöht ist, wodurch die Fähigkeit der Zellen zur Produktion von PUFAs weiter gesteigert wird. Durch Optimierung der Aktivität oder Erhöhung der Anzahl eines oder mehrerer  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase- oder  $\Delta$ -5-Desaturase-Gene, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Zerstören der Aktivität einer oder mehrerer Gene, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, wird die Steigerung der Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen in Pflanzen ermöglicht.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen werden vorteilhaft in einer Expressionskassette, die die Expression der Nukleinsäuren in Pflanzen ermöglicht, eingebracht.

Dabei werden die Nukleinsäuresequenzen, die für die  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -6-Elongase oder  $\Delta$ -5-Desaturase kodieren, mit einem

- oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und Proteine ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtsorganismus bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen, an die Induktoren oder Repressoren binden und dadurch die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen können die natürlichen Regulationselemente dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch so verändert worden sein, dass ihre natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäß verwendeten Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "Enhancer-Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatorsequenzen.
- Die  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- und/oder  $\Delta$ -6-Elongase-Gene können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein. Vorteilhaft liegt nur jeweils eine Kopie der Gene in der Expressionskassette vor. Dieses Genkonstrukt oder die Genkonstrukte können zusammen in der Wirtspflanze exprimiert werden. Dabei kann das Genkonstrukt oder die Genkonstrukte in einem oder mehreren Vektoren inseriert sein und frei in der Zelle vorliegen oder aber im Genom inseriert sein. Es ist vorteilhaft für die Insertion weiterer Gene im Wirtsgenom, wenn die zu exprimierenden Gene zusammen in einem Genkonstrukt vorliegen.
- Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.
- Eine weitere Ausführungsform der Erfindung sind ein oder mehrere Genkonstrukte, die eine oder mehrere Sequenzen enthalten, die durch SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 201 oder deren Derivate definiert sind und für Polypeptide gemäß SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 196, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 200, SEQ ID NO: 202 kodieren. Die genannten  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase- oder  $\Delta$ -5-Desaturase-Proteine führen dabei vorteilhaft zu

einer Desaturierung oder Elongierung von Fettsäuren, wobei das Substrat vorteilhaft ein, zwei, drei oder vier Doppelbindungen und vorteilhaft 18, 20 oder 22 Kohlenstoffatome im Fettsäuremolekül aufweist. Gleiches gilt für ihre Homologen, Derivate oder Analoga, die funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen, vorteilhafterweise zur Steigerung der Genexpression, verbunden sind.

Es ist im Prinzip möglich, alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen, wie die oben genannten, für das neue Verfahren zu verwenden. Es ist ebenfalls möglich und vorteilhaft, zusätzlich oder alleine synthetische Promotoren zu verwenden, besonders wenn sie eine Samen-spezifische Expression vermitteln, wie z.B. die in WO 99/16890 beschriebenen.

Um einen besonders hohen Gehalt an PUFAs vor allem in transgenen Pflanzen zu erzielen, sollten die PUFA-Biosynthesegene vorteilhaft samenspezifisch in Ölsaaten exprimiert werden. Hierzu können Samen-spezifische Promotoren verwendet werden, bzw. solche Promotoren, die im Embryo und/oder im Endosperm aktiv sind. Samen-spezifische Promotoren können prinzipiell sowohl aus dikotyledonen als auch aus monokotyledonen Pflanzen isoliert werden. Im folgenden sind bevorzugte Promotoren aufgeführt: USP (= unknown seed protein) und Vicilin (*Vicia faba*) [Bäumlein et al., Mol. Gen. Genet., 1991, 225(3)], Napin (Raps) [US 5,608,152], Conlinin (Lein) [WO 02/102970], Acyl-Carrier Protein (Raps) [US 5,315,001 und WO 92/18634], Oleosin (*Arabidopsis thaliana*) [WO 98/45461 und WO 93/20216], Phaseolin (*Phaseolus vulgaris*) [US 5,504,200], Bce4 [WO 91/13980], Leguminosen B4 (LegB4-Promotor) [Bäumlein et al., Plant J., 2,2, 1992], Lpt2 und Lpt1 (Gerste) [WO 95/15389 u. WO95/23230], Samen-spezifische Promotoren aus Reis, Mais u. Weizen [WO 99/16890], Amy32b, Amy 6-6 und Aleurain [US 5,677,474], Bce4 (Raps) [US 5,530,149], Glycinin (Soja) [EP 571 741], Phosphoenol-Pyruvatcarboxylase (Soja) [JP 06/62870], ADR12-2 (Soja) [WO 98/08962], Isocitratlyase (Raps) [US 5,689,040] oder  $\alpha$ -Amylase (Gerste) [EP 781 849].

Die Pflanzengenexpression lässt sich auch über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.

Um eine stabile Integration der Biosynthesegene in die transgene Pflanze über mehrere Generation sicherzustellen, sollte jede der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für die  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -6-Elongase und/oder  $\Delta$ -5-Desaturase kodieren, unter der Kontrolle eines eigenen, bevorzugt eines von den anderen Promotoren verschiedenen, Promotors exprimiert werden, da sich wiederholende Sequenzmotive zur Instabilität der T-DNA bzw. zu Rekombinationsereignissen führen können. Die Expressionskassette ist dabei vorteil-

haft so aufgebaut, dass einem Promotor eine geeignete Schnittstelle, vorteilhaft in einem Polylinker, zur Insertion der zu exprimierenden Nukleinsäure folgt und gegebenenfalls eine Terminatorsequenz hinter dem Polylinker liegt. Diese Abfolge wiederholt sich mehrfach, bevorzugt drei-, vier-, fünf-, sechs- oder siebenmal, so dass bis zu

5 sieben Gene in einem Konstrukt zusammengeführt werden und zur Expression in die transgene Pflanze eingebracht werden können. Vorteilhaft wiederholt sich die Abfolge bis zu viermal. Die Nukleinsäuresequenzen werden zur Expression über eine geeignete Schnittstelle beispielsweise im Polylinker hinter den Promotor inseriert. Vorteilhaft

10 hat jede Nukleinsäuresequenz ihren eigenen Promotor und gegebenenfalls ihre eigene Terminatorsequenz. Derartige vorteilhafte Konstrukte sind beispielsweise in DE 101 02 337 oder DE 101 02 338 offenbart. Es ist aber auch möglich, mehrere Nukleinsäuresequenzen hinter einem gemeinsamen Promotor und ggf. vor einer gemeinsamen Terminatorsequenz zu inserieren. Dabei ist die Insertionsstelle bzw. die Abfolge der

15 inserierten Nukleinsäuren in der Expressionskassette nicht von entscheidender Bedeutung, das heißt eine Nukleinsäuresequenz kann an erster oder letzter Stelle in der Kassette inseriert sein, ohne dass dadurch ihre Expression wesentlich beeinflusst wird. Es können in der Expressionskassette vorteilhaft unterschiedliche Promotoren wie beispielsweise der USP-, LegB4 oder DC3-Promotor und unterschiedliche Terminatorsequenzen verwendet werden. Es ist aber auch möglich, nur einen Promotortyp in der Kassette zu verwenden, was jedoch zu unerwünschten Rekombinationseignissen führen kann.

20

Wie oben beschrieben sollte die Transkription der eingebrachten Gene vorteilhaft durch geeignete Terminatorsequenzen am 3'-Ende der eingebrachten Biosynthesegene (hinter dem Stopcodon) abgebrochen werden. Verwendet werden kann hier z.B. die

25 OCS1-Terminatorsequenz. Wie auch für die Promotoren, so sollten für jedes Gen unterschiedliche Terminatorsequenzen verwendet werden.

Das Genkonstrukt kann, wie oben beschrieben, auch weitere Gene umfassen, die in die Pflanzen eingebracht werden sollen. Es ist möglich und vorteilhaft, in die Wirtspflanzen Regulationsgene, wie Gene für Induktoren, Repressoren oder Enzyme, welche durch ihre Enzymaktivität in die Regulation eines oder mehrerer Gene eines Biosynthesewegs eingreifen, einzubringen und zu exprimieren. Diese Gene können heterologen oder homologen Ursprungs sein.

30

Weiterhin können vorteilhaft im Nukleinsäurekonstrukt bzw. Genkonstrukt weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthalten sein, diese Gene können aber auch auf einem oder mehreren weiteren Nukleinsäurekonstrukten liegen. Vorteilhaft werden als Biosynthesegen des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ein Gen ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenase(n),

35

40

Lipoxygenase(n), Triacylglycerol-Lipase(n), Allenoxid-Synthase(n), Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n) oder Kombinationen davon verwendet.

Besonders vorteilhafte Nukleinsäuresequenzen sind Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe der Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase,  $\omega$ -3-Desaturase,  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -9-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase und/oder  $\Delta$ -9-Elongase.

Dabei können die vorgenannten Nukleinsäuren bzw. Gene in Kombination mit anderen Elongasen und Desaturasen in Expressionskassetten, wie den vorgenannten, kloniert werden und zur Transformation von Pflanzen mit Hilfe von Agrobakterium eingesetzt werden.

Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird. Die Expressionskassetten können prinzipiell direkt zum Einbringen in die Pflanze verwendet werden oder aber in einen Vektor eingebracht werden.

Diese vorteilhaften Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, enthalten die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für die  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen,  $\Delta$ -6-Elongasen oder  $\Delta$ -5-Desaturasen kodieren, oder ein Nukleinsäurekonstrukt, das die verwendete Nukleinsäure allein oder in Kombination mit weiteren Biosynthesegenen des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels wie den Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen,  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Desaturasen,  $\omega$ 3-Desaturasen,  $\Delta$ -4-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen und/oder  $\Delta$ -9-Elongasen enthält.

Wie hier verwendet, betrifft der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das eine andere Nukleinsäure transportieren kann, die an es gebunden ist. Ein Vektortyp ist ein "Plasmid", eine zirkuläre doppelsträngige DNA-Schleife, in die zusätzliche DNA-Segmente ligiert werden können. Ein weiterer Vektortyp ist ein viraler Vektor, wobei zusätzliche DNA-Segmente in das virale Genom ligiert werden können. Bestimmte Vektoren können in einer Wirtszelle, in die sie eingebracht worden sind, autonom replizieren (z.B. Bakterienvektoren mit bakteriellem Replikationsursprung). Andere Vektoren werden vorteilhaft beim Einbringen in die Wirtszelle in das Genom einer Wirtszelle integriert und dadurch zusammen mit dem Wirtsgenom repliziert. Zudem können bestimmte Vektoren die Expression von Genen, mit denen sie funktionsfähig verbunden sind, steuern. Diese Vektoren werden hier als "Expressionsvektoren" bezeichnet. Gewöhnlich haben Expressionsvektoren, die für DNA-Rekombinationstechniken geeignet sind, die Form von Plasmiden. In der vorliegenden Beschreibung können "Plasmid" und "Vektor" austauschbar verwendet werden, da das Plasmid die am häufigsten verwendete Vektorform ist. Die Erfindung soll jedoch



auch andere Expressionsvektorformen, wie virale Vektoren, die ähnliche Funktionen ausüben, umfassen. Ferner soll der Begriff "Vektor" auch andere Vektoren, die dem Fachmann bekannt sind, wie Phagen, Viren, wie SV40, CMV, TMV, Transposons, IS-Elemente, Phasmide, Phagemide, Cosmide, lineare oder zirkuläre DNA, umfassen.

- 5 Die im Verfahren vorteilhaft verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren umfassen die erfindungsgemäß verwendeten Nukleinsäuren oder das beschriebene Genkonstrukt in einer Form, die sich zur Expression der verwendeten Nukleinsäuren in einer Wirtszelle eignet, was bedeutet, dass die rekombinanten Expressionsvektoren eine oder mehrere Regulationssequenzen, ausgewählt auf der Basis der zur Expression verwendeten Wirtszellen, die mit der zu exprimierenden Nukleinsäuresequenz funktionsfähig verbunden ist, umfassen. In einem rekombinanten Expressionsvektor bedeutet "funktionsfähig verbunden", dass die Nukleotidsequenz von Interesse derart an die Regulationssequenz(en) gebunden ist, dass die Expression der Nukleotidsequenz möglich ist und sie aneinander gebunden sind, so dass beide Sequenzen die vorhergesagte, der Sequenz zugeschriebene Funktion erfüllen (z.B. in einem In-vitro-Transkriptions-/Translationssystem oder in einer Wirtszelle, wenn der Vektor in die Wirtszelle eingebracht wird).

- Der Begriff "Regulationssequenz" soll Promotoren, Enhancer und andere Expressionskontrollelemente (z.B. Polyadenylierungssignale) umfassen. Diese Regulationssequenzen sind z.B. beschrieben in Goeddel: Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990), oder siehe: Gruber und Crosby, in: Methods in Plant Molecular Biology and Biotechnology, CRC Press, Boca Raton, Florida, Hrsgb.: Glick und Thompson, Kapitel 7, 89-108, einschließlich der Literaturstellen darin. Regulationssequenzen umfassen solche, welche die konstitutive Expression einer Nukleotidsequenz in vielen Wirtszelltypen steuern, und solche, die die direkte Expression der Nukleotidsequenz nur in bestimmten Wirtszellen unter bestimmten Bedingungen steuern. Der Fachmann weiß, dass die Gestaltung des Expressionsvektors von Faktoren, wie der Auswahl der zu transformierenden Wirtszelle, der gewünschten Expressionsstärke des Proteins usw., abhängen kann.

- 30 Bei einer weiteren Ausführungsform des Verfahrens können die  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen,  $\Delta$ -6-Elongasen und/oder  $\Delta$ -5-Desaturasen in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen), siehe Falciatore et al., 1999, Marine Biotechnology 1 (3):239-251 und darin zitierte Literaturangaben, und Pflanzenzellen aus höheren Pflanzen (z.B. Spermatophyten, wie Feldfrüchten) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", Plant Mol. Biol. 20:1195-1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", Nucl. Acids Res. 12:8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: Transgenic Plants, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

- Eine Pflanzen-Expressionskassette enthält vorzugsweise Regulationssequenzen, welche die Genexpression in Pflanzenzellen steuern können und die funktionsfähig verbunden sind, so dass jede Sequenz ihre Funktion, wie Termination der Transkription, erfüllen kann, beispielsweise Polyadenylierungssignale. Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind diejenigen, die aus *Agrobacterium tumefaciens*-T-DNA stammen, wie das als Octopinsynthase bekannte Gen 3 des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835ff.) oder funktionelle Äquivalente davon, aber auch alle anderen in Pflanzen funktionell aktive Terminatorsequenzen sind geeignet.
- Da die Regulation der Pflanzengenexpression sehr oft nicht auf Transkriptionsebene beschränkt ist, enthält eine Pflanzen-Expressionskassette vorzugsweise andere funktionsfähig verbundene Sequenzen, wie Translationsenhancer, beispielsweise die Overdrive-Sequenz, welche die 5'-untranslatierte Leader-Sequenz aus Tabakmosaikvirus, die das Protein/RNA-Verhältnis erhöht, enthält (Gallie et al., 1987, Nucl. Acids Research 15:8693-8711).
- Das zu exprimierende Gen muss, wie oben beschrieben, funktionsfähig mit einem geeigneten Promotor verbunden sein, der die Genexpression auf rechtzeitige, zell- oder gewebespezifische Weise auslöst. Nutzbare Promotoren sind konstitutive Promotoren (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195-2202), wie diejenigen, die von Pflanzenviren stammen, wie 35S CAMV (Franck et al., Cell 21 (1980) 285-294), 19S CaMV (siehe auch US 5352605 und WO 84/02913) oder konstitutive Pflanzenpromotoren, wie der in US 4,962,028 beschriebene der kleinen Untereinheit der Rubisco.
- Die Pflanzengenexpression lässt sich auch wie oben beschrieben über einen chemisch induzierbaren Promotor erreichen (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.
- Auch Promotoren, die auf biotische oder abiotische Stressbedingungen reagieren, sind geeignet, beispielsweise der pathogeninduzierte PRP1-Gen-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993) 361-366), der hitzeinduzierbare hsp80-Promotor aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare Alpha-Amylase-Promotor aus Kartoffel (WO 96/12814) oder der durch Wunden induzierbare pinII-Promotor (EP-A-0 375 091).
- Es sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, welche die Genexpression in Geweben und Organen herbeiführen, in denen die Fettsäure-, Lipid- und Ölbiosynthese stattfindet, in Samenzellen, wie den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos. Geeignete Promotoren sind der Napin-Promotor aus Raps (US 5,608,152), der Conlinin-Promotor aus Lein (WO 02/102970), der USP-Promotor aus *Vicia faba* (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):459-67), der Oleosin-Promotor aus *Arabidopsis* (WO 98/45461), der Phaseolin-Promotor aus *Phaseolus*

- vulgaris (US 5,504,200), der Bce4-Promotor aus Brassica (WO 91/13980) oder der Legumin-B4-Promotor (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):233-9) sowie Promotoren, die die samenspezifische Expression in monokotyledonen Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis usw. herbeiführen. Geeignete beachtenswerte
- 5 Promotoren sind der lpt2- oder lpt1-Gen-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230) oder die in WO 99/16890 beschriebenen Promotoren aus dem Gersten-Hordein-Gen, dem Reis-Glutelin-Gen, dem Reis-Oryzin-Gen, dem Reis-Prolamin-Gen, dem Weizen-Gliadin-Gen, Weizen-Glutelin-Gen, dem Mais-Zein-Gen, dem Hafer-Glutelin-Gen, dem Sorghum-Kasirin-Gen, dem Roggen-Secalin-Gen.
- 10 Ebenfalls besonders geeignet sind Promotoren, welche die plastidenspezifische Expression herbeiführen, da Plastiden das Kompartiment sind, in dem die Vorläufer sowie einige Endprodukte der Lipidbiosynthese synthetisiert werden. Geeignete Promotoren sind der virale RNA-Polymerase-Promotor, beschrieben in WO 95/16783 und WO 97/06250, und der clpP-Promotor aus Arabidopsis, beschrieben in
- 15 WO 99/46394.
- Insbesondere kann die multiparallele Expression der im Verfahren verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen,  $\Delta$ -6-Elongasen und/oder  $\Delta$ -5-Desaturasen gewünscht sein. Die Einführung solcher Expressionskassetten kann über eine simultane Transformation mehrerer einzelner Expressionskonstrukte erfolgen oder
- 20 bevorzugt durch Kombination mehrerer Expressionskassetten auf einem Konstrukt. Auch können mehrere Vektoren mit jeweils mehreren Expressionskassetten transformiert und auf die Wirtszelle übertragen werden.
- Andere bevorzugte Sequenzen für die Verwendung zur funktionsfähigen Verbindung in Pflanzengenexpressions-Kassetten sind Targeting-Sequenzen, die zur Steuerung des
- 25 Genproduktes in sein entsprechendes Zellkompartiment, beispielsweise in die Vakuole, den Zellkern, alle Arten von Plastiden, wie Amyloplasten, Chloroplasten, Chromoplasten, den extrazellulären Raum, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, Ölkörper, Peroxisomen und andere Kompartimente von Pflanzenzellen notwendig sind (siehe eine Übersicht in Kermode, Crit. Rev. Plant Sci. 15, 4 (1996) 285-423
- 30 und darin zitierte Literaturstellen).
- Im erfindungsgemäßen Verfahren werden die Nukleinsäuresequenzen mit den SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199, SEQ ID NO: 201 oder deren Derivate oder Homologe, die für Polypeptide kodieren, die noch die enzymatische Aktivität der durch Nukleinsäuresequenzen
- 35 kodierten Proteine besitzen, verwendet. Diese Sequenzen werden einzeln oder in Kombination mit den Nukleinsäuresequenzen, die für die anderen verwendeten Enzyme kodieren, in Expressionskonstrukte kloniert und zur Transformation und Expression in Pflanzen verwendet. Diese Expressionskonstrukte ermöglichen durch ihre Konstruktion eine vorteilhafte optimale Synthese der im erfindungsgemäßen Verfahren produzierten
- 40 mehrfach ungesättigten Fettsäuren.

Bei einer bevorzugten Ausführungsform umfasst das Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens einer Zelle oder einer ganzen Pflanze, die die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen enthält, wobei die Zelle und/oder die Pflanze mit einer Nukleinsäuresequenz, die für ein Polypeptid mit einer  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- und/oder  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität kodiert, einem Genkonstrukt oder einem Vektor wie vorstehend beschrieben, allein oder in Kombination mit weiteren Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels kodieren, transformiert wird. Die so hergestellte Zelle ist vorteilhaft eine Zelle eines Öl-produzierenden Organismus wie einer Ölfruchtpflanze wie beispielsweise Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Hanf, Erdnuss, Soja, Färbersaflor, Hanf, Senf, Sonnenblumen oder Borretsch.

"Transgen" bzw. "Rekombinant" im Sinne der Erfindung bedeutet bezüglich zum Beispiel einer Nukleinsäuresequenz, einer Expressionskassette (= Genkonstrukt) oder einem Vektor enthaltend die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz oder einem Organismus transformiert mit den erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, Expressionskassette oder Vektor alle solche durch gentechnische Methoden zustande gekommenen Konstruktionen, in denen sich entweder

- a) die erfindungsgemäße Nukleinsäuresequenz, oder
- b) eine mit der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenz funktionell verknüpfte genetische Kontrollsequenz, zum Beispiel ein Promotor, oder
- c) (a) und (b)

sich nicht in ihrer natürlichen, genetischen Umgebung befinden oder durch gentechnische Methoden modifiziert wurden, wobei die Modifikation beispielhaft eine Substitution, Addition, Deletion, Inversion oder Insertion eines oder mehrerer Nukleotidreste sein kann. Natürliche genetische Umgebung meint den natürlichen genomischen bzw. chromosomalen Locus in dem Herkunftsorganismus oder das Vorliegen in einer genomischen Bibliothek. Im Fall einer genomischen Bibliothek ist die natürliche, genetische Umgebung der Nukleinsäuresequenz bevorzugt zumindest noch teilweise erhalten. Die Umgebung flankiert die Nukleinsäuresequenz zumindest an einer Seite und hat eine Sequenzlänge von mindestens 50 bp, bevorzugt mindestens 500 bp, besonders bevorzugt mindestens 1000 bp, ganz besonders bevorzugt mindestens 5000 bp. Eine natürlich vorkommende Expressionskassette - beispielsweise die natürlich vorkommende Kombination des natürlichen Promotors der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen mit den entsprechenden  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase- und/oder  $\Delta$ -5-Elongasegenen - wird zu einer transgenen Expressionskassette, wenn diese durch nicht-natürliche, synthetische ("künstliche") Verfahren wie beispielsweise einer Mutagenisierung geändert wird. Entsprechende Verfahren sind beispielsweise beschrieben in US 5,565,350 oder WO 00/15815.

Unter transgenen Pflanzen im Sinne der Erfindung ist daher zu verstehen, dass sich die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren nicht an ihrer natürlichen Stelle im Genom der Pflanze befinden, wobei die Nukleinsäuren homolog oder heterolog exprimiert werden können. Transgen bedeutet aber auch, dass die erfindungsgemäßen Nukleinsäuren an ihrem natürlichen Platz im Genom der Pflanze sind, dass jedoch die Sequenz gegenüber der natürlichen Sequenz verändert wurde und/oder dass die Regulationssequenzen, der natürlichen Sequenz verändert wurden. Bevorzugt ist unter transgen die Expression der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren oder der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen an nicht natürlicher Stelle im Genom zu verstehen, das heißt eine homologe oder bevorzugt heterologe Expression der Nukleinsäuren liegt vor. Bevorzugte transgene Pflanzen sind Ölsamen- oder Ölfruchtpflanzen.

Als Pflanzen zur Verwendung im erfindungsgemäßen Verfahren eignen sich prinzipiell vorteilhaft alle Pflanzen, die in der Lage sind Fettsäuren, speziell ungesättigte Fettsäuren wie ARA, EPA und/oder DHA, zu synthetisieren und die für die Expression rekombinanter Gene geeignet sind. Beispielhaft seien Pflanzen wie Arabidopsis, Asteraceae wie Calendula oder Kulturpflanzen wie Soja, Erdnuss, Rizinus, Sonnenblume, Mais, Baumwolle, Flachs, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, FärberSaflor (*Carthamus tinctorius*) oder Kakaobohne genannt. Bevorzugt werden Pflanzen, die natürlicherweise Öle in größeren Mengen synthetisieren können wie Soja, Raps, Camelina, Sareptasenf, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersaflor (*Carthamus tinctorius*), Flachs, Hanf, Rizinus, Calendula, Erdnuss, Kakaobohne oder Sonnenblume oder Hefen wie *Saccharomyces cerevisiae*, besonders bevorzugt werden Soja, Flachs, Raps, FärberSaflor, Sonnenblume, Camelina, Sareptasenf oder Calendula.

Weitere für die Klonierung der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen nutzbare Wirtszellen sind weiterhin genannt in: Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA (1990).

Verwendbare Expressionsstämme z.B. solche, die eine geringere Proteaseaktivität aufweisen sind beschrieben in: Gottesman, S., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, California (1990) 119-128.

Hierzu gehören auch Pflanzenzellen und bestimmte Gewebe, Organe und Teile von Pflanzen in all ihren Erscheinungsformen, wie Antheren, Fasern, Wurzelhaare, Stängel, Embryos, Kalli, Kotelydonen, Petiolen, Erntematerial, pflanzliches Gewebe, reproduktives Gewebe und Zellkulturen, das von der eigentlichen transgenen Pflanze abgeleitet ist und/oder dazu verwendet werden kann, die transgene Pflanze hervorzubringen.

Transgene Pflanzen bzw. vorteilhaft deren Samen, die die im erfindungsgemäßen Verfahren synthetisierten mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere ARA, EPA und/oder DHA enthalten, können vorteilhaft direkt vermarktet werden ohne dass die synthetisierten Öle, Lipide oder Fettsäuren isoliert werden müssen. Unter Pflanzen im

erfindungsgemäßen Verfahren sind ganze Pflanzen sowie alle Pflanzenteile, Pflanzenorgane oder Pflanzenteile wie Blatt, Stiel, Samen, Wurzel, Knollen, Antheren, Fasern, Wurzelhaare, Stängel, Embryos, Kalli, Kotelydonen, Petiolen, Erntematerial, pflanzliches Gewebe, reproduktives Gewebe, Zellkulturen, die sich von der transgenen Pflanze ableiten und/oder dazu verwendet werden können, die transgene Pflanze hervorzubringen. Der Samen umfasst dabei alle Samenteile wie die Samenhüllen, Epidermis- und Samenzellen, Endosperm oder Embryogewebe.

Grundsätzlich eignet sich das erfindungsgemäße Verfahren auch zur Herstellung mehrfach ungesättigter Fettsäuren, insbesondere von ARA, EPA und/oder DHA in pflanzlichen Zellkulturen und anschließender Gewinnung der Fettsäuren aus den Kulturen. Dabei kann es sich insbesondere um Suspensions- oder Kalluskulturen handeln.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Verbindungen können aber auch aus den Pflanzen vorteilhaft aus den Pflanzensamen in Form ihrer Öle, Fett, Lipide und/oder freien Fettsäuren isoliert werden. Durch dieses Verfahren hergestellte mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere ARA, EPA und/oder DHA, lassen sich durch Ernten der Pflanzen bzw. Pflanzensamen entweder aus der Kultur, in der sie wachsen, oder vom Feld ernten.

Bei einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfasst dieses Verfahren ferner den Schritt des Gewinnens der Öle, Lipide oder freien Fettsäuren aus der Pflanze oder aus der Kultur. Bei der Kultur kann es sich beispielsweise um eine Treibhaus- oder Feldkultur einer Pflanze handeln.

Das Isolieren der Öle, Lipide oder freien Fettsäuren kann über Pressen oder Extraktion der Pflanzenteile bevorzugt der Pflanzensamen, erfolgen. Dabei können die Öle, Fette, Lipide und/oder freien Fettsäuren durch sogenanntes kalt schlagen oder kalt pressen ohne Zuführung von Wärme durch Pressen gewonnen werden. Damit sich die Pflanzenteile speziell die Samen leichter aufschließen lassen, werden sie vorher zerkleinert, gedämpft oder geröstet. Die so vorbehandelten Samen können anschließend gepresst werden oder mit Lösungsmittel wie warmen Hexan extrahiert werden. Anschließend wird das Lösungsmittel wieder entfernt.

Danach werden die so erhaltenen Produkte, die die mehrfach ungesättigten Fettsäuren enthalten, weiter bearbeitet, das heißt raffiniert. Dabei werden zunächst beispielsweise die Pflanzenschleime und Trübstoffe entfernt. Die sogenannte Entschleimung kann enzymatisch oder beispielsweise chemisch/physikalisch durch Zugabe von Säure wie Phosphorsäure erfolgen. Anschließend werden die freien Fettsäuren durch Behandlung mit einer Base beispielsweise Natronlauge entfernt. Das erhaltene Produkt wird zur Entfernung der im Produkt verbliebenen Lauge mit Wasser gründlich gewaschen und getrocknet. Um die noch im Produkt enthaltenen Farbstoffe zu entfernen werden die Produkte einer Bleichung mit beispielsweise Bleicherde oder Aktivkohle unterzogen. Zum Schluss wird das Produkt noch beispielsweise mit Wasserdampf desodoriert.

Vorzugsweise sind die durch dieses Verfahren produzierten PUFAs bzw. LCPUFAs C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremoleküle vorteilhaft C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremoleküle mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt mit vier, fünf oder sechs Doppelbindungen. Diese C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuremoleküle lassen sich aus der Pflanze in Form eines Öls, Lipids oder einer freien Fettsäure isolieren. Geeignete Pflanzen sind beispielsweise die vorstehend erwähnten. Bevorzugte Organismen sind transgene Pflanzen.

Eine Ausführungsform der Erfindung sind deshalb Öle, Lipide oder Fettsäuren oder Fraktionen davon, die durch das oben beschriebene Verfahren hergestellt worden sind, besonders bevorzugt Öl, Lipid oder eine Fettsäurezusammensetzung, die PUFAs umfassen und von transgenen Pflanzen herrühren.

Die im Verfahren gewonnenen Fettsäuren eignen sich auch als Ausgangsmaterial für die chemische Synthese von weiteren Wertprodukten. Sie können beispielsweise in Kombination miteinander oder allein zur Herstellung von Pharmaka, Nahrungsmittel, Tierfutter oder Kosmetika verwendet werden.

Diese Öle, Lipide oder Fettsäuren enthalten wie oben beschrieben vorteilhaft 6 bis 15 % Palmitinsäure, 1 bis 6 % Stearinsäure; 7 – 85 % Ölsäure; 0,5 bis 8 % Vaccensäure, 0,1 bis 1 % Arachinsäure, 7 bis 25 % gesättigte Fettsäuren, 8 bis 85 % einfach ungesättigte Fettsäuren und 60 bis 85 % mehrfach ungesättigte Fettsäuren jeweils bezogen auf 100 % und auf den Gesamtfettsäuregehalt der Organismen. Als vorteilhafte mehrfach ungesättigte Fettsäure sind in den Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische bevorzugt mindestens 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,8; 0,9 oder 1 % bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt an Arachidonsäure enthalten. Weiterhin enthalten die Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, vorteilhaft Fettsäuren ausgewählt aus der Gruppe der Fettsäuren Erucasäure (13-Docosaensäure), Sterculinsäure (9,10-Methylene octadec-9-enonsäure), Malvalinsäure (8,9-Methylen Heptadec-8-enonsäure), Chaulmoogrinsäure (Cyclopenten-dodecansäure), Furan-Fettsäure (9,12-Epoxy-octadeca-9,11-dienonsäure), Vernonsäure (9,10-Epoxyoctadec-12-enonsäure), Tarinsäure (6-Octadecynonsäure), 6-Nonadecynonsäure, Santalbinsäure (11-Octadecen-9-ynoic acid), 6,9-Octadecenyonsäure, Pyrulinsäure (10-Heptadecen-8-ynonsäure), Crepenyninsäure (9-Octadecen-12-ynonsäure), 13,14-Dihydrooropheinsäure, Octadecen-13-ene-9,11-diynonsäure, Petroselensäure (cis-6-Octadecenonsäure), 9c,12t-Octadecadiensäure, Calendulasäure (8t10t12c-Octadecatriensäure), Catalpinsäure (9t11t13c-Octadecatriensäure), Eleosterinsäure (9c11t13t-Octadecatriensäure), Jacarinsäure (8c10t12c-Octadecatriensäure), Punicinsäure (9c11t13c-Octadecatriensäure), Parinarinsäure (9c11t13t15c-Octadecatetraensäure), Pinolensäure (all-cis-5,9,12-Octadecatriensäure), Laballensäure (5,6-Octadecadienallensäure), Ricinolsäure (12-Hydroxyölsäure) und/oder Coriolinsäure (13-Hydroxy-9c,11t-Octadecadienonsäure). Die vorgenannten Fettsäuren kommen in den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemischen

in der Regel vorteilhaft nur in Spuren vor, das heißt sie kommen bezogen auf die Gesamtfettsäuren zu weniger als 30 %, bevorzugt zu weniger als 25 %, 24 %, 23 %, 22 % oder 21 %, besonders bevorzugt zu weniger als 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % oder 5 %, ganz besonders bevorzugt zu weniger als 4 %, 3 %, 2 % oder 1 % vor. In einer weiteren bevorzugten Form der Erfindung kommen diese vorgenannten Fettsäuren bezogen auf die Gesamtfettsäuren zu weniger als 0,9%; 0,8%; 0,7%; 0,6%; oder 0,5%, besonders bevorzugt zu weniger als 0,4%; 0,3%; 0,2%; 0,1% vor. Vorteilhaft enthalten die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische weniger als 0,1 % bezogen auf die Gesamtfettsäuren und/oder keine Butterbuttersäure, kein Cholesterin, keine Clupanodonsäure (= Docosapentaensäure, C22:5<sup>Δ4,8,12,15,21</sup>) sowie keine Nisinsäure (Tetracosahexaensäure, C23:6<sup>Δ3,8,12,15,18,21</sup>).

Die vorgenannten Fettsäuren kommen in den nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemischen in der Regel vorteilhaft nur in Spuren vor, das heißt sie kommen bezogen auf die Gesamtfettsäuren zu weniger als 30 %, bevorzugt zu weniger als 25 %, 24 %, 23 %, 22 % oder 21 %, besonders bevorzugt zu weniger als 20 %, 15 %, 10 %, 9 %, 8 %, 7 %, 6 % oder 5 %, ganz besonders bevorzugt zu weniger als 4 %, 3 %, 2 % oder 1 % vor. In einer weiteren bevorzugten Form der Erfindung kommen diese vorgenannten Fettsäuren bezogen auf die Gesamtfettsäuren zu weniger als 0,9%; 0,8%; 0,7%; 0,6%; oder 0,5%, besonders bevorzugt zu weniger als 0,4%; 0,3%; 0,2%; 0,1% vor. Vorteilhaft enthalten die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Fettsäureester bzw. Fettsäuregemische weniger als 0,1 % bezogen auf die Gesamtfettsäuren und/oder keine Buttersäure, kein Cholesterin, keine Clupanodonsäure (= Docosapentaensäure, C22:5<sup>Δ4,8,12,15,21</sup>) sowie keine Nisinsäure (Tetracosahexaensäure, C23:6<sup>Δ3,8,12,15,18,21</sup>).

Vorteilhaft enthalten die erfindungsgemäßen Öle, Lipide oder Fettsäuren mindestens 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9% oder 10%, vorteilhaft mindestens 11%, 12%, 13%, 14%, 15%, 16% oder 17%, besonders vorteilhaft mindestens 18%, 19%, 20%, 21%, 22%, 23%, 24% oder 25% ARA oder mindestens 0,5%, 1%, 2%, 3%, 4%, 5% oder 6%, vorteilhaft mindestens 7%, 8%, 9%, 10% oder 11% besonders vorteilhaft mindestens 12%, 13%, 14%, 15%, 16%, 17%, 18%, 19% oder 20% EPA oder mindestens 0,01%, 0,02%, 0,03%, 0,04% oder 0,05% oder 0,06%, vorteilhaft mindestens 0,07%, 0,08%, 0,09 oder 0,1%, besonders vorteilhaft mindestens 0,2%, 0,3% oder 0,4% DHA bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt des Produktionsorganismus vorteilhaft einer Pflanze, besonders vorteilhaft einer Ölfruchtpflanze wie Soja, Raps, Kokosnuss, Ölpalme, Färbersafflor, Flachs, Hanf, Rizinus, Calendula, Erdnuss, Kakaobohne, Sonnenblume oder den oben genannten weiteren ein- oder zweikeimblättrigen Ölfruchtpflanzen. Alle Prozentangaben beziehen sich auf Gewichtsprozent.

Durch die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen bzw. im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen kann eine Steigerung der Ausbeute an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, vor allem an ARA und EPA aber auch DHA, von mindestens 50, 80 oder 100 %, vorteilhaft von mindestens 150, 200 oder 250 %,



- besonders vorteilhaft von mindestens 300, 400, 500, 600, 700, 800 oder 900 %, ganz besonders vorteilhaft von mindestens 1000, 1100, 1200, 1300, 1400 oder 1500 % gegenüber der nicht transgenen Ausgangspflanze beispielsweise einer Pflanze wie *Brassica juncea*, *Brassica napus*, *Camelina sativa*, *Arabidopsis thaliana* oder *Linum usitatissimum* beim Vergleich in der GC-Analyse siehe Beispiele erreicht werden.

- Die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Lipide und/oder Öle haben einen höheren Anteil der ungesättigten Fettsäuren Ölsäure, Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure in sn2-Position im Vergleich zu den anderen Positionen sn1 und sn3. Unter höheren Anteil sind Verhältnisse von (sn1:sn2:sn3) 1:1,1:1; 1:1,5:1 bis 1:3:1 zu verstehen. Auch die im Verfahren hergestellte Arachidonsäure, Eicosapentaensäure oder Docosahe-
- 10 xaensäure zeigen in den Lipiden und/oder Ölen ebenfalls eine Präferenz für die sn2-Position im Triglycerid gegenüber den Positionen sn1 und sn3 von vorteilhaft 1:1,1:1; 1:1,5:1 bis 1:3:1.

- Vorteilhaft werden, wie oben beschrieben, die im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Molekül im Samen von Pflanzen, die keine oder nur sehr geringe Mengen an C<sub>12</sub>:0- bzw. C<sub>14</sub>:0-Fettsäuren enthalten. Auch noch kürzere gesättigte Fettsäuren wie die Fettsäuren C<sub>4</sub>:0, C<sub>6</sub>:0, C<sub>8</sub>:0 oder C<sub>10</sub>:0 sollten nicht oder nur in geringen Mengen im Lipid und/oder Öl vorhanden sein. Unter nur sehr geringen Mengen sind vorteilhaft
- 20 Mengen zu verstehen, die in der GC-Analyse vorteilhaft unter 5, 4, 3, 2 oder 1 %, vorteilhaft unter 0,9; 0,8; 0,7; 0,6 oder 0,5 %, besonders vorteilhaft unter 0,4; 0,3; 0,2 oder 0,1 %, ganz besonders bevorzugt unter 0,09; 0,08; 0,07; 0,06; 0,05; 0,04; 0,03; 0,02 oder 0,01 Flächeneinheiten in der GC liegen. Die Fettsäure C<sub>16</sub>:0 sollte vorteilhaft in einem Bereich von 1 bis 28 % GC-Flächeneinheiten liegen. Vorteilhaft sollte die
- 25 Fettsäure C<sub>16</sub>:0 in GC-Flächeneinheiten von weniger als 25%, 20%, 15% oder 10%, vorteilhaft von weniger als 9%, 8%, 7%, 6% oder 5%, besonders vorteilhaft von weniger als 4%, 3%, 2% oder 1% oder gar nicht in den Lipiden, Ölen und/oder freien Fettsäuren vorhanden sein. Die Fettsäure C<sub>16</sub>:1 sollte vorteilhaft weniger als 1; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 oder 0,1 %, besonders vorteilhaft 0,09; 0,08; 0,07; 0,06; 0,05; 0,04; 0,03; 0,02 oder 0,01 Flächeneinheiten in der GC betragen. Ganz besonders bevorzugt sollte die Fettsäure C<sub>16</sub>:1 nicht in den nach dem Verfahren hergestellten Ölen und/oder Lipiden vorhanden sein. Gleiches gilt für die Fettsäuren C<sub>15</sub>:0, C<sub>17</sub>:0, C<sub>16</sub>:1<sup>Δ<sup>3</sup></sup>trans, C<sub>16</sub>:4<sup>Δ<sup>4,7,10,13</sup></sup> und C<sub>18</sub>:5<sup>Δ<sup>3,6,9,12,15</sup></sup>. Neben Ölsäure (C<sub>18</sub>:1<sup>Δ<sup>9</sup></sup>) können auch die Isomere (C<sub>18</sub>:1<sup>Δ<sup>7</sup></sup>, C<sub>18</sub>:1<sup>Δ<sup>11</sup></sup>) in den Lipiden, Ölen oder freien Fettsäuren vorhanden sein.
- 35 Vorteilhaft in Mengen, gemessen als GC-Flächeneinheiten, von weniger als 5%, 4%, 3%, 2% oder 1%. Die Fettsäuren C<sub>20</sub>:0, C<sub>20</sub>:1, C<sub>24</sub>:0 und C<sub>24</sub>:1 sollten jeweils in einem Bereich von 0 bis 1 %, 0 bis 3% bzw. 0 bis 5 % Flächeneinheiten in der GC liegen. Weiterhin sollte in der GC-Analyse wenig Dihomo- $\gamma$ -linolensäure (= DGLA) im Samenöl und/oder -lipid in GC-Flächeneinheiten detektierbar sein. Unter wenig sind
- 40 weniger als 2; 1,9; 1,8; 1,7; 1,6 oder 1,5 %, vorteilhaft weniger als 1,4; 1,3; 1,2; 1,1 oder 1 %, besonders vorteilhaft weniger als 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5 oder 0,4 % in GC-Flächeneinheiten zu verstehen.

In einer bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens sollte DGLA und ARA in einem Verhältnis von 1:1 bis zu 1:100, vorteilhaft von 1:2 bis zu 1:80, besonders vorteilhaft von 1:3 bis zu 1:70, ganz besonders bevorzugt von 1:5 bis zu 1:60 entstehen.

- 5 In weiteren bevorzugten Ausführungsform des Verfahrens sollte DGLA und EPA in einem Verhältnis von 1:1 bis zu 1:100, vorteilhaft von 1:2 bis zu 1:80, besonders vorteilhaft von 1:3 bis zu 1:70, ganz besonders bevorzugt von 1:5 bis zu 1:60 entstehen.

- 10 Vorteilhaft sollten die im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten Lipide, Öle und/oder freien Fettsäuren einen hohen Anteil von ungesättigten Fettsäuren vorteilhaft von mehrfach ungesättigten Fettsäuren von mindestens 30, 40 oder 50 Gew.-%, vorteilhaft von mindestens 60, 70 oder 80 Gew.-% bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt in den Samen der transgenen Pflanzen betragen.

- 15 Alle gesättigten Fettsäuren zusammen sollten vorteilhaft in den Lipiden, Ölen und/oder freien Fettsäuren bevorzugt verwendeten Pflanzen nur einen geringen Anteil ausmachen. Unter geringen Anteil ist in diesem Zusammenhang ein Anteil in GC-Flächeneinheiten von weniger als 15%, 14%, 13%, 12%, 11% oder 10%, bevorzugt von weniger als 9%, 8%, 7% oder 6% zu verstehen.

- 20 Im Verfahren hergestellte Lipide, Öle und/oder freie Fettsäuren sollten vorteilhaft einen Gehalt an Erucasäure von weniger als 2 Gew.-% bezogen auf den Gesamtfettsäuregehalt der Pflanze haben. Vorteilhaft sollte keine Erucasäure in den Lipiden und/oder Ölen vorhanden sein. Auch sollte der Gehalt an gesättigten Fettsäuren C16:0 und/oder C18:0 vorteilhaft geringer als 19, 18, 17, 16, 15, 14, 13, 12, 11, oder 10 Gew.-%, vorteilhaft weniger als 9, 8, 7, 6 oder 5 Gew.-% bezogen auf den gesamten Fettsäuregehalt der Lipide und/oder Öle sein. Vorteilhaft sollten auch längere Fettsäuren wie  
25 C20:0 oder C22:1 gar nicht oder in nur geringen Mengen vorteilhaft geringer als 4, 3, 2 oder 1 Gew.-%, vorteilhaft weniger als 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 oder 0,1 Gew.-% bezogen auf den gesamten Fettsäuregehalt der Lipide und/oder Öle sein. Typischerweise ist in den Lipiden und/oder Ölen, die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren hergestellt wurden, kein oder nur in geringen Mengen C16:1 als Fettsäure  
30 enthalten. Unter geringen Mengen sind vorteilhaft Gehalte an Fettsäuren zu verstehen, die geringer als 4, 3, 2 oder 1 Gew.-%, vorteilhaft weniger als 0,9; 0,8; 0,7; 0,6; 0,5; 0,4; 0,3; 0,2 oder 0,1 Gew.-% bezogen auf den gesamten Fettsäuregehalt der Lipide und/oder Öle.

- 35 Die nach dem Pressen erhaltenen erfindungsgemäßen Öle, Lipide, Fettsäuren oder Fettsäuregemische werden als sogenannte Rohöle bezeichnet. Diese enthalten noch die gesamten Öl- und/oder Lipidkomponenten, sowie Verbindungen, die in diesen löslich sind. Derartige Verbindungen sind die verschiedenen Tocopherole wie  $\alpha$ -Tocopherol,  $\beta$ -Tocopherol,  $\gamma$ -Tocopherol und/oder  $\delta$ -Tocopherol oder Phytosterole wie Brassicasterol, Campesterol, Stigmasterol,  $\beta$ -Sitosterol, Sitostanol,  $\Delta^5$ -Avenasterol,  
40  $\Delta^5$ ,24-Stigmastadienol,  $\Delta^7$ -Stigmastenol oder  $\Delta^7$ -Avenasterol. Diese Verbindungen sind in einem Bereich von 1 bis 1000 mg/100 g vorteilhaft von 10 bis 800 mg/100 g Lipid

oder Öl enthalten. Auch Triterpene wie Germaniol, Amyrin, Cycloartanol und andere können in diesen Lipiden und Ölen enthalten sein. Diese Lipide und/oder Öle enthalten die im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren wie ARA, EPA und/oder DHA gebunden in polaren und unpolaren Lipiden wie Phospholipiden z.B.

- 5 Phosphatidylcholin, Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylinositol, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin, Galactolipiden, Monoglyceride, Diglyceride oder Triglyceride um nur einige zu nennen. Auch Lysophospholipide können in den Lipiden und/oder Ölen vorkommen. Diese Komponenten der Lipide und/oder Öle können durch geeignete Methoden voneinander getrennt werden. Nicht enthalten in diesen Rohölen ist
- 10 Cholesterol.

- Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung des Öls, Lipids, der Fettsäuren und/oder der Fettsäurezusammensetzung in Futtermitteln, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika. Die erfindungsgemäßen Öle, Lipide, Fettsäuren oder Fettsäuregemische können in der dem Fachmann bekannten Weise zur
- 15 Abmischung mit anderen Ölen, Lipiden, Fettsäuren oder Fettsäuregemischen tierischen Ursprungs wie z.B. Fischölen verwendet werden. Typisch für derartige Fischöle kurzkettige Fettsäuren wie C12:0, C14:0, C14:1, verzweigtkettiges C15:0, C15:0, C16:0 oder C16:1. Auch mehrfach ungesättigte C16-Fettsäuren wie C16:2, C16:3 oder C16:4, verzweigtkettiges C17:0, C17:1, verzweigtkettiges C18:0 und C19:0 sowie
- 20 C19:0 und C19:1 kommen im Fischöl vor. Derartige Fettsäuren sind typisch für Fischöle und werden nur selten oder gar nicht in pflanzlichen Ölen gefunden. Wirtschaftlich relevante Fischöle sind z.B. Anchovissöl, Menhadneöl, Tunfischöl, Sardinenöl, Heringsöl, Markrelenöl, Walöl und Lachsöl. Diese Lipide und/oder Öle tierischen Ursprungs können zum Abmischen mit den erfindungsgemäßen Ölen in Form von
- 25 Rohölen, das heißt in Form von Lipiden und/oder Ölen, die noch nicht aufgereinigt wurden, verwendet werden oder aber es können verschieden aufgereinigte Fraktionen zum Abmischen verwendet werden.

- Eine weitere erfindungsgemäße Ausführungsform ist die Verwendung des Öls, Lipids, Fettsäuren und/oder der Fettsäurezusammensetzung in Futtermitteln, Nahrungsmitteln,
- 30 Kosmetika oder Pharmazeutika.

- Die erfindungsgemäßen Öle, Lipide, Fettsäuren oder Fettsäuregemische können in der dem Fachmann bekannten Weise zur Abmischung mit anderen Ölen, Lipiden, Fettsäuren oder Fettsäuregemischen tierischen Ursprungs wie z.B. Fischölen verwendet werden. Auch diese Öle, Lipide, Fettsäuren oder Fettsäuregemische, die aus pflanzlichen und tierischen Bestandteilen bestehen, können zur Herstellung von Futtermitteln,
- 35 Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika verwendet werden.

- Unter dem Begriff "Öl", "Lipid" oder "Fett" wird ein Fettsäuregemisch verstanden, das ungesättigte, gesättigte, vorzugsweise veresterte Fettsäure(n) enthält. Bevorzugt ist, dass das Öl, Lipid oder Fett einen hohen Anteil an mehrfach ungesättigten freien oder
- 40 vorteilhaft veresterten Fettsäure(n), insbesondere Linolsäure,  $\gamma$ -Linolensäure, Dihomo- $\gamma$ -linolensäure, Arachidonsäure,  $\alpha$ -Linolensäure, Stearidonsäure, Eicosatetraensäure,

- Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure hat. Vorzugsweise ist der Anteil an ungesättigten veresterten Fettsäuren ungefähr 30 %, mehr bevorzugt ist ein Anteil von 50 %, noch mehr bevorzugt ist ein Anteil von 60 %, 70 %, 80 %, 85% oder mehr. Zur Bestimmung kann z.B. der Anteil an Fettsäure nach
- 5 Überführung der Fettsäuren in die Methylestern durch Umesterung gaschromatographisch bestimmt werden. Das Öl, Lipid oder Fett kann verschiedene andere gesättigte oder ungesättigte Fettsäuren, z.B. Calendulasäure, Palmitin-, Palmitolein-, Stearin-, Ölsäure etc., enthalten. Insbesondere kann je nach Ausgangspflanze der Anteil der verschiedenen Fettsäuren in dem Öl oder Fett schwanken.
- 10 Bei den im Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigte Fettsäuren mit vorteilhaft mindestens zwei Doppelbindungen enthalten, handelt es sich wie oben beschrieben beispielsweise um Sphingolipide, Phosphoglyceride, Lipide, Glycolipide, Phospholipide, Monoacylglycerin, Diacylglycerin, Triacylglycerin oder sonstige Fettsäureester.
- Aus den so im erfindungsgemäßen Verfahren hergestellten mehrfach ungesättigte
- 15 Fettsäuren mit vorteilhaft mindestens fünf oder sechs Doppelbindungen lassen sich die enthaltenden mehrfach ungesättigten Fettsäuren beispielsweise über eine Alkalibehandlung beispielsweise wäßrige KOH oder NaOH oder saure Hydrolyse vorteilhaft in Gegenwart eines Alkohols wie Methanol oder Ethanol oder über eine enzymatische Abspaltung freisetzen und isolieren über beispielsweise Phasentrennung und anschließender Ansäuerung über z.B.  $H_2SO_4$ . Die Freisetzung der Fettsäuren kann auch
- 20 direkt ohne die vorhergehend beschriebene Aufarbeitung erfolgen.
- Moose und Algen sind die einzigen bekannten Pflanzensysteme, die erhebliche Mengen an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie Arachidonsäure (ARA) und/oder Eicosapentaensäure (EPA) und/oder Docosahexaensäure (DHA) herstellen. Moose
- 25 enthalten PUFAs in Membranlipiden während Algen, algenverwandte Organismen und einige Pilze auch nennenswerte Mengen an PUFAs in der Triacylglycerolfraction akkumulieren. Daher eignen sich Nukleinsäuremoleküle, die aus solchen Stämmen isoliert werden, die PUFAs auch in der Triacylglycerolfraction akkumulieren, besonders vorteilhaft für das erfindungsgemäße Verfahren und damit zur Modifikation des Lipid-
- 30 und PUFA-Produktionssystems in einem Wirt, insbesondere Pflanzen, wie Ölfuchtpflanzen, beispielsweise Raps, Canola, Lein, Hanf, Soja, Sonnenblumen, Borretsch. Sie sind deshalb vorteilhaft im erfindungsgemäßen Verfahren verwendbar.
- Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren können nach Einbringung in eine Pflanzenzelle bzw. Pflanze entweder auf einem separaten Plasmid liegen oder
- 35 vorteilhaft in das Genom der Wirtszelle integriert sein. Bei Integration in das Genom kann die Integration zufallsgemäß sein oder durch derartige Rekombination erfolgen, dass das native Gen durch die eingebrachte Kopie ersetzt wird, wodurch die Produktion der gewünschten Verbindung durch die Zelle moduliert wird, oder durch Verwendung eines Gens in trans, so dass das Gen mit einer funktionellen Expressionseinheit,
- 40 welche mindestens eine die Expression eines Gens gewährleistende Sequenz und mindestens eine die Polyadenylierung eines funktionell transkribierten Gens gewähr-

leistende Sequenz enthält, funktionell verbunden ist. Vorteilhaft werden die Nukleinsäuren über Multiexpressionskassetten oder Konstrukte zur multiparallelen Expression in die Organismen vorteilhaft zur multiparallelen samenspezifischen Expression von Genen in die Pflanzen gebracht.

- 5 Die Co-Expression mehrerer Gene kann natürlich nicht nur durch Einbringen der Gene auf einem gemeinsamen rekombinanten Nukleinsäurekonstrukt erfolgen. Vielmehr können einzelne Gene auch separat – gleichzeitig oder nacheinander – auf verschiedenen Konstrukten eingebracht werden. Hier wird z.B. durch die Verwendung verschiedener Selektionsmarker die gleichzeitige Anwesenheit in der alle Gene co-
- 10 exprimierenden Pflanze sichergestellt. Diese Pflanze kann das Produkt eines oder mehrerer Transformationsvorgänge sein, oder aber auch ein Kreuzungsprodukt von Pflanzen, die eines oder mehrere der Gene enthalten.

- Als Substrate der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für Polypeptide mit  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -6-
- 15 Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase- und/oder  $\Delta$ -9-Elongase-Aktivität kodieren, und/oder den weiteren verwendeten Nukleinsäuren wie den Nukleinsäuren, die für Polypeptide des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-
- 20 ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenase(n), Lipoxygenase(n), Triacylglycerol-Lipase(n), Allenoxid-Synthase(n), Hydroperoxid-
- 25 Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n) kodieren, eignen sich vorteilhaft C<sub>16</sub>-, C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren. Bevorzugt werden die im Verfahren als Substrate umgesetzten Fettsäuren in Form ihrer Acyl-CoA-Ester und/oder ihrer Phospholipid-Ester umgesetzt. Vorteilhaft werden im Verfahren Desaturasen verwendet, die eine Spezifität für die Acyl-CoA-Ester haben. Dies hat den Vorteil, dass kein Austausch zwischen den Phospholipid-Estern, die in der Regel das Substrat der Desaturierung sind, und den
- 30 Acyl-CoA-Estern stattfinden muss. Dadurch entfällt ein weiterer Enzymschritt, der, wie sich gezeigt hat, in einigen Fällen ein limitierender Schritt ist.

- Zur Herstellung der erfindungsgemäßen langkettigen PUFAs müssen die mehrfach ungesättigten C<sub>16</sub>- oder C<sub>18</sub>-Fettsäuren zunächst durch die enzymatische Aktivität einer
- 35 Desaturase desaturiert und anschließend über eine Elongase um mindestens zwei Kohlenstoffatome verlängert werden. Nach einer Elongationsrunde führt diese Enzymaktivität zu C<sub>18</sub>- oder C<sub>20</sub>-Fettsäuren und nach zwei Elongationsrunden zu C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren. Die Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Desaturasen und Elongasen führt vorzugsweise zu C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren vorteilhaft mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise
- 40 mit drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, besonders bevorzugt zu C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise mit drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen, am meisten bevorzugt mit vier, fünf

oder sechs Doppelbindungen im Molekül. Besonders bevorzugte Produkte des erfindungsgemäßen Verfahrens sind Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure. Die C<sub>18</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei Doppelbindungen in der Fettsäure können durch die erfindungsgemäße enzymatische Aktivität in Form der freien Fettsäure oder in Form der Ester, wie Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide, Phosphoglyceride, Monoacylglycerin, Diacylglycerin oder Triacylglycerin, verlängert werden.

Der bevorzugte Biosyntheseort von Fettsäuren, Ölen, Lipiden oder Fette in den vorteilhaft verwendeten Pflanzen ist beispielsweise im allgemeinen der Samen oder Zellschichten des Samens, so dass eine samenspezifische Expression der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren sinnvoll ist. Es ist jedoch naheliegend, dass die Biosynthese von Fettsäuren, Ölen oder Lipiden nicht auf das Samengewebe beschränkt sein muss, sondern auch in allen übrigen Teilen der Pflanze - beispielsweise in Epidermiszellen oder in den Knollen - gewebespezifisch erfolgen kann.

Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Nukleinsäuren, die für eine  $\Delta$ -5-Elongase codieren, können im Verfahren die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren mindestens um 5 %, bevorzugt mindestens um 10 %, besonders bevorzugt mindestens um 20 %, ganz besonders bevorzugt um mindestens 50 % gegenüber dem Wildtyp der Organismen, die die Nukleinsäuren nicht rekombinant enthalten, erhöht werden.

Durch das erfindungsgemäße Verfahren können die hergestellten mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den im Verfahren verwendeten Pflanzen prinzipiell auf zwei Arten erhöht werden. Es kann entweder der Pool an freien mehrfach ungesättigten Fettsäuren und/oder der Anteil der über das Verfahren hergestellten veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren erhöht werden. Vorteilhaft wird durch das erfindungsgemäße Verfahren der Pool an veresterten mehrfach ungesättigten Fettsäuren in den transgenen Organismen erhöht.

Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand sind isolierte Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongase codieren, wobei die durch die Nukleinsäuresequenzen codierten  $\Delta$ -5-Elongasen C<sub>20</sub>-Fettsäuren mit mindestens vier Doppelbindungen im Fettsäuremolekül umsetzen; die vorteilhaft letztlich in Diacylglyceride und/oder Triacylglyceride eingebaut werden.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist somit eine isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongase codiert und die in SEQ ID NO: 197 dargestellte Sequenz hat.

Ein weiterer Erfindungsgegenstand ist eine isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität codiert und die in SEQ ID NO: 199 dargestellte Sequenz hat.

Noch ein weiterer Erfindungsgegenstand ist eine isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturaseaktivität codiert und die in SEQ ID NO: 201 dargestellte Sequenz hat.

- 5 Ebenfalls zu den Erfindungsgegenständen gehört ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend:
- a) eine oder mehrere Kopien eines in Pflanzenzellen, bevorzugt in Samenzellen, aktiven Promotors,
  - b) mindestens eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 193 oder SEQ ID NO: 201 dargestellten Sequenz, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase-Aktivität kodiert,
  - 10 c) mindestens eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz, die für eine  $\Delta$ -5-Desaturase-Aktivität kodiert,
  - d) mindestens eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 199 dargestellten Sequenz, die für eine  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität kodiert, und
  - e) eine oder mehrere Kopien einer Terminatorsequenz.
- 15 Vorteilhaft kann in dem rekombinanten vorgenannten Nukleinsäuremolekül noch zusätzlich eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 195 dargestellten Sequenz, die für eine  $\Delta$ -12-Desaturase kodiert, enthalten sein.
- In einer weiteren vorteilhaften Ausführungsform kann in dem rekombinanten Nukleinsäuremolekül vorteilhaft noch zusätzlich eine Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 197 dargestellten Sequenz, die für eine  $\Delta$ -5-Elongase kodiert, enthalten sein.
- 20 Neben diesen genannten Sequenzen können in das rekombinante Nukleinsäuremolekül noch weitere Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxigenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen und Fettsäure-Elongase(n) eingebracht werden.
- 25
- 30 Bevorzugt sind dies Gene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Desaturase- oder  $\Delta$ -9-Elongase.
- Ein weiterer Erfindungsgegenstand sind Genkonstrukte, die die erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 195, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 oder SEQ ID NO: 201 enthalten, wobei die Nukleinsäure funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbunden ist.
- 35

Vorteilhaft stammen alle die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen aus einem eukaryontischen Organismus wie einer Pflanze, einem Mikroorganismus wie einer Alge oder einem Tier. Bevorzugt stammen die Nukleinsäuresequenzen aus der Ordnung Salmoniformes, Xenopus oder Ciona, Algen wie Mantoniella, Cryptocodinium, Euglena oder Ostreococcus, Pilzen wie der Gattung Phytophthora oder von Diatomeen wie den Gattungen Thalassiosira oder Phaeodactylum.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen, die für Proteine mit  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Desaturase-,  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase- oder  $\Delta$ -9-Elongase-Aktivität codieren, werden vorteilhaft allein oder bevorzugt in Kombination in einer Expressionskassette (= Nukleinsäurekonstrukt), die die Expression der Nukleinsäuren in einer Pflanze, eingebracht. Es kann im Nukleinsäurekonstrukt mehr als eine Nukleinsäuresequenz einer enzymatischen Aktivität wie z.B. einer  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\Delta$ -4-Desaturase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase,  $\Delta$ -6-Elongase und/oder  $\omega$ -3-Desaturase enthalten sein.

Zum Einbringen in die Pflanze werden die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren vorteilhaft einer Amplifikation und Ligation in bekannter Weise, wie oben beschrieben, unterworfen.

Es gibt eine Reihe von Mechanismen, durch die eine Veränderung des erfindungsgemäßen  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase- und/oder  $\omega$ -3-Desaturase-Proteins sowie der weiteren im Verfahren verwendeten Proteine wie die  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase- oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Proteine möglich ist, so dass die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der vorteilhaft mehrfach ungesättigten Fettsäuren in einer Pflanze bevorzugt in einer Ölfruchtpflanze aufgrund dieses veränderten Proteins direkt beeinflusst werden kann. Die Anzahl oder Aktivität der  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Proteine oder -Gene kann erhöht werden, so dass größere Mengen der Genprodukte und damit letztlich größere Mengen der Verbindungen der allgemeinen Formel I hergestellt werden. Auch eine de novo Synthese in einer Pflanze, der die Aktivität und Fähigkeit zur Biosynthese der Verbindungen vor dem Einbringen des/der entsprechenden Gens/Gene fehlte, ist möglich. Entsprechendes gilt für die Kombination mit weiteren Desaturasen oder Elongasen oder weiteren Enzymen aus dem Fettsäure- und Lipidstoffwechsel. Auch die Verwendung verschiedener divergenter, d.h. auf DNA-Sequenzebene unterschiedlicher Sequenzen kann dabei vorteilhaft sein bzw. die Verwendung von Promotoren zur Genexpression, die eine andere zeitliche Genexpression z.B. abhängig vom Reifegrad eines Samens oder Ölspeichernden Gewebes ermöglicht.



Durch das Einbringen eines  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- und/oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Genes in eine Pflanze allein oder in Kombination mit anderen Genen in eine Zelle kann nicht nur den Biosynthesefluss zum Endprodukt erhöht, sondern auch die entsprechende Triacylglycerin-Zusammensetzung erhöht oder de novo geschaffen werden. Ebenso kann die Anzahl oder Aktivität anderer Gene, die am Import von Nährstoffen, die zur Biosynthese einer oder mehrerer Fettsäuren, Ölen, polaren und/oder neutralen Lipiden nötig sind, erhöht sein, so dass die Konzentration dieser Vorläufer, Cofaktoren oder Zwischenverbindungen innerhalb der Zellen oder innerhalb des Speicherkompartiments erhöht ist, wodurch die Fähigkeit der Zellen zur Produktion von PUFAs, wie im folgenden beschrieben, weiter gesteigert wird. Durch Optimierung der Aktivität oder Erhöhung der Anzahl einer oder mehrerer  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Gene, die an der Biosynthese dieser Verbindungen beteiligt sind, oder durch Zerstören der Aktivität einer oder mehrerer Gene, die am Abbau dieser Verbindungen beteiligt sind, kann es möglich sein, die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion von Fettsäure- und Lipidmolekülen aus Organismen und vorteilhaft aus Pflanzen zu steigern.

Die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten isolierten Nukleinsäuremoleküle codieren für Proteine oder Teile von diesen, wobei die Proteine oder das einzelne Protein oder Teile davon eine Aminosäuresequenz enthält, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz ist, die in den Sequenzen SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 200 oder SEQ ID NO: 202 dargestellt ist, so dass die Proteine oder Teile davon noch eine  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Aktivität aufweisen. Vorzugsweise haben die Proteine oder Teile davon, die von dem Nukleinsäuremolekül/den Nukleinsäuremolekülen kodiert wird/werden, noch seine wesentliche enzymatische Aktivität und die Fähigkeit, am Stoffwechsel von zum Aufbau von Zellmembranen oder Lipidkörperchen in Organismen vorteilhaft in Pflanzen notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über diese Membranen teilzunehmen. Vorteilhaft sind die von den Nukleinsäuremolekülen kodierten Proteine zu mindestens etwa 50 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 % und stärker bevorzugt mindestens etwa 70 %, die im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten isolierten Nukleinsäuremoleküle codieren für Proteine oder Teile von diesen, wobei die Proteine oder das einzelne Protein oder Teile davon eine Aminosäuresequenz enthält, die ausreichend homolog zu einer Aminosäuresequenz ist, die in den Sequenzen SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO:6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 200 oder SEQ ID NO: 202 dargestellt ist, so dass die Proteine oder Teile davon noch eine  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Aktivität aufweisen.

80 % oder 90 % und am stärksten bevorzugt mindestens etwa 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr identisch zu den in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 200 oder SEQ ID NO: 202 dargestellten Aminosäuresequenzen. Im Sinne der Erfindung ist unter Homologie oder homolog, Identität oder identisch zu verstehen.

Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für das Vergleichen verschiedener Sequenzen stehen dem Fachmann eine Reihe von Programmen, die auf verschiedenen Algorithmen beruhen zur Verfügung. Dabei liefern die Algorithmen von Needleman und Wunsch oder Smith und Waterman besonders zuverlässige Ergebnisse. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981)), die im GCG Software-Packet [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind. Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm GAP über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 und Average Mismatch: 0.000. Diese Einstellungen wurden, falls nicht anders angegeben, immer als Standardeinstellungen für Sequenzvergleiche verwendet wurden.

Unter wesentlicher enzymatischer Aktivität der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase oder  $\Delta$ -4-Desaturase ist zu verstehen, dass sie gegenüber den durch die Sequenz mit SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID

- NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 oder SEQ ID NO: 201 und deren Derivate codierten Proteinen/Enzymen im Vergleich noch mindestens eine enzymatische Aktivität von mindestens 10 %, bevorzugt 20 %, besonders bevorzugt 30 % und ganz besonders 40 % aufweisen und damit am Stoffwechsel von zum Aufbau von Fettsäuren, Fettsäureester wie Diacylglyceride und/oder Triacylglyceride in einem Organismus vorteilhaft einer Pflanze oder Pflanzenzelle notwendigen Verbindungen oder am Transport von Molekülen über Membranen teilnehmen können, wobei C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Kohlenstoffketten im Fettsäuremolekül mit Doppelbindungen an mindestens zwei, vorteilhaft drei, vier, fünf oder sechs Stellen gemeint sind.
- Vorteilhaft im Verfahren verwendbare Nukleinsäuren stammen aus Bakterien, Pilzen, Diatomeen, Tieren wie *Caenorhabditis* oder *Oncorhynchus* oder Pflanzen wie Algen oder Moosen wie den Gattungen *Shewanella*, *Physcomitrella*, *Thraustochytrium*, *Fusarium*, *Phytophthora*, *Ceratodon*, *Mantoniella*, *Ostreococcus*, *Isochrysis*, *Aleurita*, *Muscarioides*, *Mortierella*, *Borago*, *Phaeodactylum*, *Cryptocodinium*, speziell aus den Gattungen und Arten *Oncorhynchus mykiss*, *Xenopus laevis*, *Ciona intestinalis*, *Thalassiosira pseudonana*, *Mantoniella squamata*, *Ostreococcus* sp., *Ostreococcus tauri*, *Euglena gracilis*, *Physcomitrella patens*, *Phytophthora infestans*, *Fusarium gramineum*, *Cryptocodinium cohnii*, *Ceratodon purpureus*, *Isochrysis galbana*, *Aleurita farinosa*, *Thraustochytrium* sp., *Muscarioides viallii*, *Mortierella alpina*, *Borago officinalis*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Caenorhabditis elegans* oder besonders vorteilhaft aus *Oncorhynchus mykiss*, *Euglena gracilis*, *Thalassiosira pseudonana* oder *Cryptocodinium cohnii*.
- Alternativ können im erfindungsgemäßen Verfahren Nukleotidsequenzen verwendet werden, die für eine  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\omega$ -3-Desaturase,  $\Delta$ -9-Elongase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase oder  $\Delta$ -4-Desaturase codieren und die an eine Nukleotidsequenz, wie in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 oder SEQ ID NO: 201 dargestellt, vorteilhaft unter stringenten Bedingungen hybridisieren.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen werden vorteilhaft in einer Expressionskassette, die die Expression der Nukleinsäuren in Organismen wie Mikroorganismen oder Pflanzen ermöglicht, eingebracht.

- Dabei werden die Nukleinsäuresequenzen, die für die  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\omega$ -3-Desaturase,  $\Delta$ -9-Elongase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase oder  $\Delta$ -4-Desaturase codieren, mit einem oder mehreren Regulationssignalen vorteilhafterweise zur Erhöhung der Genexpression funktionell verknüpft. Diese regulatorischen Sequenzen sollen die gezielte Expression der Gene und der Proteinexpression ermöglichen. Dies kann beispielsweise je nach Wirtspflanze bedeuten, dass das Gen erst nach Induktion exprimiert und/oder überexprimiert wird, oder dass es sofort exprimiert und/oder überexprimiert wird. Beispielsweise handelt es sich bei diesen regulatorischen Sequenzen um Sequenzen an die Induktoren oder Repressoren binden und so die Expression der Nukleinsäure regulieren. Zusätzlich zu diesen neuen Regulationssequenzen oder anstelle dieser Sequenzen kann die natürliche Regulation dieser Sequenzen vor den eigentlichen Strukturgenen noch vorhanden sein und gegebenenfalls genetisch verändert worden sein, so dass die natürliche Regulation ausgeschaltet und die Expression der Gene erhöht wurde. Die Expressionskassette (= Expressionskonstrukt = Genkonstrukt) kann aber auch einfacher aufgebaut sein, das heißt es wurden keine zusätzlichen Regulationssignale vor die Nukleinsäuresequenz oder dessen Derivate inseriert und der natürliche Promotor mit seiner Regulation wurde nicht entfernt. Stattdessen wurde die natürliche Regulationssequenz so mutiert, dass keine Regulation mehr erfolgt und/oder die Genexpression gesteigert wird. Diese veränderten Promotoren können in Form von Teilsequenzen (= Promotor mit Teilen der erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen) auch allein vor das natürliche Gen zur Steigerung der Aktivität gebracht werden. Das Genkonstrukt kann außerdem vorteilhafterweise auch eine oder mehrere sogenannte "enhancer Sequenzen" funktionell verknüpft mit dem Promotor enthalten, die eine erhöhte Expression der Nukleinsäuresequenz ermöglichen. Auch am 3'-Ende der DNA-Sequenzen können zusätzliche vorteilhafte Sequenzen inseriert werden wie weitere regulatorische Elemente oder Terminatoren. Die  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ 5-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase-,  $\Delta$ -6-Elongase- und/oder  $\Delta$ -9-Elongase-Gene können in einer oder mehreren Kopien in der Expressionskassette (= Genkonstrukt) enthalten sein. Vorteilhaft liegt nur jeweils eine Kopie der Gene in der Expressionskassette vor. Dieses Genkonstrukt oder die Genkonstrukte können zusammen im Wirtsorganismus exprimiert werden. Dabei kann das Genkonstrukt oder die Genkonstrukte in einem oder mehreren Vektoren inseriert sein und frei in der Zelle vorliegen oder aber im Genom inseriert sein. Es ist vorteilhaft für die Insertion weiterer Gene im Wirtsgenom, wenn die zu exprimierenden Gene zusammen in einem Genkonstrukt vorliegen.
- Die regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen. So kann eine Verstärkung der regulatorischen Elemente vorteilhafterweise auf der Transkriptionsebene erfolgen, indem starke Transkriptionssignale wie

Promotoren und/oder "Enhancer" verwendet werden. Daneben ist aber auch eine Verstärkung der Translation möglich, indem beispielsweise die Stabilität der mRNA verbessert wird.

- Vorteilhafte Regulationssequenzen für das neue Verfahren liegen beispielsweise in
- 5 Promotoren vor, wie den Pflanzenpromotoren CaMV/35S [Franck et al., Cell 21 (1980) 285–294], PRP1 [Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993)], SSU, OCS, lib4, usp, STLS1, B33, nos oder im Ubiquitin- oder Phaseolin-Promotor vor. In diesem Zusammenhang vorteilhaft sind ebenfalls induzierbare Promotoren, wie die in EP-A-0 388 186 (Benzylsulfonamid-induzierbar), Plant J. 2, 1992:397–404 (Gatz et al., Tetracyclin-
- 10 induzierbar), EP-A-0 335 528 (Abzinsäure-induzierbar) oder WO 93/21334 (Ethanol- oder Cyclohexenol-induzierbar) beschriebenen Promotoren. Weitere geeignete Pflanzenpromotoren sind der Promotor von cytosolischer FBPase oder der ST-LSI-Promotor der Kartoffel (Stockhaus et al., EMBO J. 8, 1989, 2445), der Phosphoribosylpyrophosphatamidotransferase-Promotor aus Glycine max (Genbank-Zugangsnr. U87999) oder der in EP-A-0 249 676 beschriebene nodienspezifische Promotor.
- 15 Besonders vorteilhafte Promotoren sind Promotoren, welche die Expression in Geweben ermöglichen, die an der Fettsäurebiosynthese beteiligt sind. Ganz besonders vorteilhaft sind samenspezifische Promotoren, wie der ausführungsgemäße USP Promotor aber auch andere Promotoren wie der LeB4-, DC3, Phaseolin- oder Napin-
- 20 Promotor. Weitere besonders vorteilhafte Promotoren sind samenspezifische Promotoren, die für monokotyle oder dikotyle Pflanzen verwendet werden können und in US 5,608,152 (Napin-Promotor aus Raps), WO 98/45461 (Oleosin-Promotor aus Arabidopsis), US 5,504,200 (Phaseolin-Promotor aus Phaseolus vulgaris), WO 91/13980 (Bce4-Promotor aus Brassica), von Baumelein et al., Plant J., 2, 2, 1992:233–239 (LeB4-Promotor aus einer Leguminose) beschrieben sind, wobei sich diese Promotoren für Dikotyledonen eignen. Die folgenden Promotoren eignen sich beispielsweise für Monokotyledonen lpt-2- oder lpt-1-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230), Hordein-Promotor aus Gerste und andere, in
- 25 WO 99/16890 beschriebene geeignete Promotoren.
- 30 Es ist im Prinzip möglich, alle natürlichen Promotoren mit ihren Regulationssequenzen, wie die oben genannten, für das neue Verfahren zu verwenden. Es ist ebenfalls möglich und vorteilhaft, zusätzlich oder alleine synthetische Promotoren zu verwenden, besonders wenn sie eine Samen-spezifische Expression vermitteln, wie z.B. beschrieben in WO 99/16890.
- 35 Um einen besonders hohen Gehalt an PUFAs vor allem in transgenen Pflanzen zu erzielen, sollten die PUFA-Biosynthesegene vorteilhaft samenspezifisch in Ölsaaten exprimiert werden. Hierzu können Samen-spezifische Promotoren verwendet werden, bzw. solche Promotoren die im Embryo und/oder im Endosperm aktiv sind. Samen-spezifische Promotoren können prinzipiell sowohl aus dikotyledonen als auch aus
- 40 monokotyledonen Pflanzen isoliert werden. Derartige vorteilhafte Promotoren sind weiter oben aufgeführt z.B. der USP-, Vicilin-, Napin-, Oleosin-, Phaseolin-, Bce4-, LegB4-, lpt2-, lpt1-, Amy32b-, Amy 6-6-, Aleurain- oder Bce4-Promotor.

Darüber hinaus sind auch chemisch induzierbaren Promotor vorteilhaft im erfindungsgemäßen Verfahren nutzbar.

- Weitere vorteilhafte Promotoren, die vorteilhaft zur Expression in Soya geeignet sind, sind die Promotoren der  $\beta$ -Conglycinin- $\alpha$ -Untereinheit, der  $\beta$ -Conglycinin- $\beta$ -Untereinheit, des Kunitz-Trypsininhibitors, des Annexin, des Glysinin, des Albumin 2S, des Legumin A1, des Legumin A2 und der des BD30.

Besonders vorteilhafte Promotoren sind der USP-, LegB4-, Fad3-, SBP-, DC-3- oder Cruciferin820 Promotor.

- Vorteilhafte Regulationssequenzen, die für die Expression der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuresequenzen benutzt werden, sind Terminatoren für die Expression vorteilhaft in Soya sind der Leg2A3', Kti3', Phas3', BD30 3' oder der AIS3'.

Besonders vorteilhafte Terminatoren sind der A7T-, OCS-, LeB3T- oder cat-Terminator.

- Um eine stabile Integration der Biosynthesegene in die transgene Pflanze über mehrere Generation sicherzustellen, sollte, wie oben beschrieben, jede der im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für die  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\omega$ -3-Desaturase,  $\Delta$ -9-Elongase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase und/oder  $\Delta$ -4-Desaturase codieren, unter der Kontrolle eines eigenen bevorzugt eines unterschiedlichen Promotors exprimiert werden, da sich wiederholende Sequenzmotive zu Instabilität der T-DNA bzw. zu Rekombinationsereignissen führen können. Das Genkonstrukt kann, wie oben beschrieben, auch weitere Gene umfassen, die in die Pflanze eingebracht werden sollen.

- Die zur Expression der im erfindungsgemäßen Verfahren verwendeten Nukleinsäuren vorteilhaft genutzten regulatorischen Sequenzen bzw. Faktoren können dabei wie oben beschrieben vorzugsweise die Genexpression der eingeführten Gene positiv beeinflussen und dadurch erhöhen.

- Diese vorteilhaften Vektoren, vorzugsweise Expressionsvektoren, enthalten die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuren, die für die  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Elongasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen oder  $\Delta$ -4-Desaturasen codieren, oder ein Nukleinsäurekonstrukt, die die verwendeten Nukleinsäure allein oder in Kombination mit weiteren Biosynthesegenen des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels wie den Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen,  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -4-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Desaturasen,  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\omega$ 3-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen,  $\Delta$ -6-Elongasen und/oder  $\Delta$ -9-Elongasen.

Wie hier verwendet und beschrieben, betrifft der Begriff "Vektor" ein Nukleinsäuremolekül, das eine andere Nukleinsäure transportieren kann, an welche es gebunden ist.

Die verwendeten rekombinanten Expressionsvektoren können zur Expression von  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Elongasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen und/oder  $\Delta$ -4-Desaturasen in prokaryotischen oder eukaryotischen Zellen gestaltet sein. Dies ist vorteilhaft, da häufig Zwischenschritte der Vektorkonstruktion der Einfachheit halber in Mikroorganismen durchgeführt werden. Beispielsweise können die  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- und/oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Gene in bakteriellen Zellen, Insektenzellen (unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren), Hefe- und anderen Pilzzellen (siehe Romanos, M.A., et al. (1992) "Foreign gene expression in yeast: a review", *Yeast* 8:423-488; van den Hondel, C.A.M.J.J., et al. (1991) "Heterologous gene expression in filamentous fungi", in: *More Gene Manipulations in Fungi*, J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428: Academic Press: San Diego; und van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi", in: *Applied Molecular Genetics of Fungi*, Peberdy, J.F., et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge), Algen (Falciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1, 3:239-251), Ciliaten der Typen: Holotrichia, Peritrichia, Spirotrichia, Suctoria, Tetrahymena, Paramecium, Colpidium, Glaucoma, Platyophrya, Potomacus, Desaturaseudocohnilembus, Euplotes, Engelmaniella und Stylonychia, insbesondere der Gattung Stylonychia lemnae, mit Vektoren nach einem Transformationsverfahren, wie beschrieben in WO 98/01572, sowie bevorzugt in Zellen vielzelliger Pflanzen (siehe Schmidt, R. und Willmitzer, L. (1988) "High efficiency Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of Arabidopsis thaliana leaf and cotyledon explants" *Plant Cell Rep.* 5:583-586; *Plant Molecular Biology and Biotechnology*, C Press, Boca Raton, Florida, Kapitel 6/7, S.71-119 (1993); F.F. White, B. Jeness et al., *Techniques for Gene Transfer*, in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press (1993), 128-43; Potrykus, *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Molec. Biol.* 42 (1991), 205-225 (und darin zitierte Literaturstellen)) exprimiert werden. Geeignete Wirtszellen werden ferner erörtert in Goeddel, *Gene Expression Technology: Methods in Enzymology* 185, Academic Press, San Diego, CA (1990). Der rekombinante Expressionsvektor kann alternativ, zum Beispiel unter Verwendung von T7-Promotor-Regulationssequenzen und T7-Polymerase, in vitro transkribiert und translatiert werden.

Die Expression von Proteinen in Prokaryoten, vorteilhaft zu einfacher Detektion der enzymatischen Aktivität z.B. zum Nachweis der Desaturase- oder Elongaseaktivität, erfolgt meist mit Vektoren, die konstitutive oder induzierbare Promotoren enthalten, welche die Expression von Fusions- oder nicht-Fusionsproteinen steuern. Typische Fusions-Expressionsvektoren sind u.a. pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith, D.B., und Johnson, K.S. (1988) *Gene* 67:31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, MA) und pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, NJ), bei denen Glutathion-S-Transferase (GST), Maltose E-bindendes Protein bzw. Protein A an das rekombinante Zielprotein fusioniert wird.

Beispiele für geeignete induzierbare nicht-Fusions-E. coli-Expressionsvektoren sind u.a. pTrc (Amann et al. (1988) Gene 69:301-315) und pET 11d (Studier et al., Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Kalifornien (1990) 60-89). Die Zielgenexpression vom pTrc-Vektor beruht auf der

- 5 Transkription durch Wirts-RNA-Polymerase von einem Hybrid-trp-lac-Fusionspromotor. Die Zielgenexpression aus dem pET 11d-Vektor beruht auf der Transkription von einem T7-gn10-lac-Fusions-Promotor, die von einer coexprimierten viralen RNA-Polymerase (T7 gn1) vermittelt wird. Diese virale Polymerase wird von den Wirtsstämmen BL21 (DE3) oder HMS174 (DE3) von einem residenten  $\lambda$ -Prophagen  
10 bereitgestellt, der ein T7 gn1-Gen unter der Transkriptionskontrolle des lacUV 5-Promotors birgt.

Andere in prokaryotischen Organismen geeignete Vektoren sind dem Fachmann bekannt, diese Vektoren sind beispielsweise in E. coli pLG338, pACYC184, die pBR-Reihe, wie pBR322, die pUC-Reihe, wie pUC18 oder pUC19, die M113mp-Reihe, pKC30, pRep4, pHS1, pHS2, pPLc236, pMBL24, pLG200, pUR290, pIN-III113-B1,  $\lambda$ gt11 or pBdCI, in Streptomyces pIJ101, pIJ364, pIJ702 oder pIJ361, in Bacillus pUB110, pC194 oder pBD214, in Corynebacterium pSA77 oder pAJ667.

- Bei einer weiteren Ausführungsform ist der Expressionsvektor ein Hefe-Expressionsvektor. Beispiele für Vektoren zur Expression in der Hefe *S. cerevisiae* umfassen  
20 pYeDesaturasec1 (Baldari et al. (1987) Embo J. 6:229-234), pMFa (Kurjan und Herskowitz (1982) Cell 30:933-943), pJRY88 (Schultz et al. (1987) Gene 54:113-123) sowie pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, CA). Vektoren und Verfahren zur Konstruktion von Vektoren, die sich zur Verwendung in anderen Pilzen, wie den filamentösen Pilzen, eignen, umfassen diejenigen, die eingehend beschrieben sind in:  
25 van den Hondel, C.A.M.J.J., & Punt, P.J. (1991) "Gene transfer systems and vector development for filamentous fungi, in: Applied Molecular Genetics of fungi, J.F. Peberdy et al., Hrsgb., S. 1-28, Cambridge University Press: Cambridge, oder in: More Gene Manipulations in Fungi [J.W. Bennet & L.L. Lasure, Hrsgb., S. 396-428: Academic Press: San Diego]. Weitere geeignete Hefevektoren sind beispielsweise pAG-1,  
30 YE6, YE13 oder pEMBLye23.

- Alternativ können die  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Elongasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen und/oder  $\Delta$ -4-Desaturasen in Insektenzellen unter Verwendung von Baculovirus-Expressionsvektoren exprimiert werden. Baculovirus-Vektoren, die zur Expression von  
35 Proteinen in gezüchteten Insektenzellen (z.B. Sf9-Zellen) verfügbar sind, umfassen die pAc-Reihe (Smith et al. (1983) Mol. Cell Biol. 3:2156-2165) und die pVL-Reihe (Lucklow und Summers (1989) Virology 170:31-39).

- Die oben genannten Vektoren bieten nur einen kleinen Überblick über mögliche geeignete Vektoren. Weitere Plasmide sind dem Fachmann bekannt und sind zum  
40 Beispiel beschrieben in: Cloning Vectors (Hrsgb. Pouwels, P.H., et al., Elsevier, Amsterdam-New York-Oxford, 1985, ISBN 0 444 904018). Weitere geeignete Expres-



sionssysteme für prokaryotische und eukaryotische Zellen siehe in den Kapiteln 16 und 17 von Sambrook, J., Fritsch, E.F., und Maniatis, T., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2. Auflage, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.

- 5 Zum Nachweis der Enzymaktivität können die  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Elongasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen und/oder  $\Delta$ -4-Desaturasen in einzelligen Pflanzenzellen (wie Algen), siehe Falciatore et al., 1999, *Marine Biotechnology* 1 (3):239-251 und darin zitierte Literaturangaben, und Pflanzenzellen aus höheren Pflanzen (z.B. Spermatophyten, wie
- 10 Feldfrüchten) exprimiert werden. Beispiele für Pflanzen-Expressionsvektoren umfassen solche, die eingehend beschrieben sind in: Becker, D., Kemper, E., Schell, J., und Masterson, R. (1992) "New plant binary vectors with selectable markers located proximal to the left border", *Plant Mol. Biol.* 20:1195-1197; und Bevan, M.W. (1984) "Binary Agrobacterium vectors for plant transformation", *Nucl. Acids Res.* 12:8711-8721; Vectors for Gene Transfer in Higher Plants; in: *Transgenic Plants*, Bd. 1, Engineering and Utilization, Hrsgb.: Kung und R. Wu, Academic Press, 1993, S. 15-38.

- Eine Pflanzen-Expressionskassette enthält vorzugsweise Regulationssequenzen, welche die Genexpression in Pflanzenzellen steuern können und funktionsfähig verbunden sind, so dass jede Sequenz ihre Funktion, wie Termination der Transkription, erfüllen kann, beispielsweise Polyadenylierungssignale. Bevorzugte Polyadenylierungssignale sind diejenigen, die aus *Agrobacterium tumefaciens*-T-DNA stammen, wie das als Octopinsynthese bekannte Gen 3 des Ti-Plasmids pTiACH5 (Gielen et al., EMBO J. 3 (1984) 835ff.) oder funktionelle Äquivalente davon, aber auch alle anderen in Pflanzen funktionell aktiven Terminatoren sind geeignet.
- 20

- 25 Da die Pflanzengenexpression sehr oft nicht auf Transkriptionsebenen beschränkt ist, enthält eine Pflanzen-Expressionskassette vorzugsweise andere funktionsfähig verbunden Sequenzen, wie Translationsenhancer, beispielsweise die Overdrive-Sequenz, welche die 5'-untranslatierte Leader-Sequenz aus Tabakmosaikvirus, die das Protein/RNA-Verhältnis erhöht, enthält (Gallie et al., 1987, *Nucl. Acids Research* 15:8693-8711).
- 30

- Die Pflanzengenexpression muss wie oben beschrieben funktionsfähig mit einem geeigneten Promotor verbunden sein, der die Genexpression auf rechtzeitige, zell- oder gewebespezifische Weise durchführt. Nutzbare Promotoren sind konstitutive Promotoren (Benfey et al., EMBO J. 8 (1989) 2195-2202), wie diejenigen, die von Pflanzenviren stammen, wie 35S CaMV (Franck et al., *Cell* 21 (1980) 285-294), 19S CaMV (siehe auch US 5352605 und WO 84/02913) oder Pflanzenpromotoren, wie der in US 4,962,028 beschriebene der kleinen Untereinheit der Rubisco.
- 35

- Andere bevorzugte Sequenzen für die Verwendung zur funktionsfähigen Verbindung in Pflanzengenexpressions-Kassetten sind Targeting-Sequenzen, die zur Steuerung des Genproduktes in sein entsprechendes Zellkompartiment notwendig sind (siehe eine Übersicht in Kermode, *Crit. Rev. Plant Sci.* 15, 4 (1996) 285-423 und darin zitierte
- 40

Literaturstellen), beispielsweise in die Vakuole, den Zellkern, alle Arten von Plastiden, wie Amyloplasten, Chloroplasten, Chromoplasten, den extrazellulären Raum, die Mitochondrien, das Endoplasmatische Retikulum, Ölkörper, Peroxisomen und andere Kompartimente von Pflanzenzellen.

- 5 Die Pflanzengenexpression lässt sich auch wie oben beschrieben über einen chemisch induzierbaren Promotor erleichtern (siehe eine Übersicht in Gatz 1997, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 48:89-108). Chemisch induzierbare Promotoren eignen sich besonders, wenn gewünscht wird, dass die Genexpression auf zeitspezifische Weise erfolgt. Beispiele für solche Promotoren sind ein Salicylsäure-induzierbarer Promotor (WO 95/19443), ein Tetracyclin-induzierbarer Promotor (Gatz et al. (1992) Plant J. 2, 397-404) und ein Ethanol-induzierbarer Promotor.

- Auch Promotoren, die auf biotische oder abiotische Stressbedingungen reagieren, sind geeignete Promotoren, beispielsweise der pathogeninduzierte PRP1-Gen-Promotor (Ward et al., Plant. Mol. Biol. 22 (1993) 361-366), der hitzeinduzierbare hsp80-Promotor aus Tomate (US 5,187,267), der kälteinduzierbare Alpha-Amylase-Promotor aus Kartoffel (WO 96/12814) oder der durch Wunden induzierbare pinII-Promotor (EP-A-0 375 091).

- Es sind insbesondere solche Promotoren bevorzugt, welche die Genexpression in Geweben und Organen herbeiführen, in denen die Fettsäure-, Lipid- und Ölbiogenese stattfindet, in Samenzellen, wie den Zellen des Endosperms und des sich entwickelnden Embryos. Geeignete Promotoren sind der Napingen-Promotor aus Raps (US 5,608,152), der USP-Promotor aus *Vicia faba* (Baeumlein et al., Mol Gen Genet, 1991, 225 (3):459-67), der Oleosin-Promotor aus *Arabidopsis* (WO 98/45461), der Phaseolin-Promotor aus *Phaseolus vulgaris* (US 5,504,200), der Bce4-Promotor aus Brassica (WO 91/13980) oder der Legumin-B4-Promotor (LeB4; Baeumlein et al., 1992, Plant Journal, 2 (2):233-9) sowie Promotoren, welche die samenspezifische Expression in Monokotyledonen-Pflanzen, wie Mais, Gerste, Weizen, Roggen, Reis usw. herbeiführen. Geeignete beachtenswerte Promotoren sind der lpt2- oder lpt1-Gen-Promotor aus Gerste (WO 95/15389 und WO 95/23230) oder die in WO 99/16890 beschriebenen (Promotoren aus dem Gersten-Hordein-Gen, dem Reis-Glutelin-Gen, dem Reis-Oryzin-Gen, dem Reis-Prolamin-Gen, dem Weizen-Gliadin-Gen, Weizen-Glutelin-Gen, dem Mais-Zein-Gen, dem Hafer-Glutelin-Gen, dem Sorghum-Kasirin-Gen, dem Roggen-Secalin-Gen).

- Insbesondere kann die multiparallele Expression der im Verfahren verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturasen,  $\omega$ -3-Desaturasen,  $\Delta$ -9-Elongasen,  $\Delta$ -6-Desaturasen,  $\Delta$ -8-Desaturasen,  $\Delta$ -6-Elongasen,  $\Delta$ -5-Desaturasen,  $\Delta$ -5-Elongasen und/oder  $\Delta$ -4-Desaturasen gewünscht sein. Die Einführung solcher Expressionskassetten kann über eine simultane Transformation mehrerer einzelner Expressionskonstrukte erfolgen oder bevorzugt durch Kombination mehrerer Expressionskassetten auf einem Konstrukt. Auch können mehrere Vektoren mit jeweils mehreren Expressionskassetten transformiert und auf die Wirtszelle übertragen werden.

- Ebenfalls besonders geeignet sind Promotoren, welche die plastidenspezifische Expression herbeiführen, da Plastiden das Kompartiment sind, in dem die Vorläufer sowie einige Endprodukte der Lipidbiosynthese synthetisiert werden. Geeignete Promotoren, wie der virale RNA-Polymerase-Promotor, sind beschrieben in
- 5 WO 95/16783 und WO 97/06250, und der clpP-Promotor aus Arabidopsis, beschrieben in WO 99/46394.

- Vektor-DNA lässt sich in prokaryotische oder eukaryotische Zellen über herkömmliche Transformations- oder Transfektionstechniken einbringen. Die Begriffe "Transformation" und "Transfektion", Konjugation und Transduktion, wie hier verwendet, sollen eine
- 10 Vielzahl von im Stand der Technik bekannten Verfahren zum Einbringen fremder Nukleinsäure (z.B. DNA) in eine Wirtszelle, einschließlich Calciumphosphat- oder Calciumchlorid-Coprazipitation, DEAE-Dextran-vermittelte Transfektion, Lipofektion, natürliche Kompetenz, chemisch vermittelter Transfer, Elektroporation oder Teilchenbeschuss, umfassen. Geeignete Verfahren zur Transformation oder Transfektion
- 15 von Wirtszellen, einschließlich Pflanzenzellen, lassen sich finden in Sambrook et al. (Molecular Cloning: A Laboratory Manual., 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) und anderen Labor-Handbüchern, wie Methods in Molecular Biology, 1995, Bd. 44, Agrobacterium protocols, Hrsgb: Gartland und Davey, Humana Press, Totowa, New Jersey.
- 20 Die vorteilhafterweise verwendeten Wirtsorganismen sind Pflanzenzellen vorzugsweise Pflanzen oder Teile davon. Besonders bevorzugt sind Pflanzen, wie Ölsamen- oder Ölfuchtpflanzen, die große Mengen an Lipidverbindungen enthalten, wie Raps, Nachtkerze, Hanf, Diestel, Erdnuss, Canola, Lein, Soja, Saflor, Sareptasenf, Sonnenblume, Borretsch, oder Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis,
- 25 Gerste, Baumwolle, Maniok, Pfeffer, Tagetes, Solanaceen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölplume, Kokosnuss) sowie ausdauernde Gräser und Futterfeldfrüchte. Besonders bevorzugte erfindungsgemäße Pflanzen sind Ölfuchtpflanzen, wie Soja, Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Hanf, Nachtkerze, Sonnenblume, Saflor, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss).
- 30

- Ein weiterer erfindungsgemäßer Gegenstand ist, wie oben beschrieben, eine isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongase-Aktivität codiert und die die in SEQ ID NO: 197 dargestellte Sequenz hat, wobei die durch die Nukleinsäuresequenz codierte Elongase  $C_{16}$ - und  $C_{18}$ - Fettsäuren mit einer Doppelbindung nicht
- 35 elongiert. Auch mehrfach ungesättigte  $C_{18}$ -Fettsäuren mit einer  $\Delta$ 6-Doppelbindung oder  $C_{22}$ -Fettsäuren werden nicht umgesetzt. Durch die enzymatische Aktivität werden vorteilhaft nur mehrfach ungesättigte  $C_{20}$ -Fettsäuren mit einer  $\Delta$ 5-Doppelbindung elongiert. Weitere Erfindungsgegenstände sind, wie oben beschrieben, eine  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -6-Desaturase und eine  $\Delta$ -12-Desaturase.
- 40 Der Begriff "Nukleinsäure(molekül)", wie hier verwendet, umfasst in einer vorteilhaften Ausführungsform zudem die am 3'- und am 5'-Ende des kodierenden Genbereichs

gelegene untranslatierte Sequenz: mindestens 500, bevorzugt 200, besonders bevorzugt 100 Nukleotide der Sequenz stromaufwärts des 5'-Endes des kodierenden Bereichs und mindestens 100, bevorzugt 50, besonders bevorzugt 20 Nukleotide der Sequenz stromabwärts des 3'-Endes des kodierenden Genbereichs. Ein "isoliertes" Nukleinsäuremolekül wird von anderen Nukleinsäuremolekülen abgetrennt, die in der natürlichen Quelle der Nukleinsäure vorliegen. Eine "isolierte" Nukleinsäure hat vorzugsweise keine Sequenzen, welche die Nukleinsäure in der genomischen DNA des Organismus, aus dem die Nukleinsäure stammt, natürlicherweise flankieren (z.B. Sequenzen, die sich an den 5'- und 3'-Enden der Nukleinsäure befinden). Bei verschiedenen Ausführungsformen kann das isolierte  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturasemolekül zum Beispiel weniger als etwa 5 kb, 4 kb, 3 kb, 2 kb, 1 kb, 0,5 kb oder 0,1 kb an Nukleotidsequenzen enthalten, die natürlicherweise das Nukleinsäuremolekül in der genomischen DNA der Zelle, aus der die Nukleinsäure stammt flankieren.

Die im Verfahren verwendeten Nukleinsäuremoleküle, z.B. ein Nukleinsäuremolekül mit einer Nukleotidsequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 oder SEQ ID NO: 201 oder eines Teils davon, kann unter Verwendung molekularbiologischer Standardtechniken und der hier bereitgestellten Sequenzinformation isoliert werden. Auch kann Mithilfe von Vergleichsalgorithmen beispielsweise eine homologe Sequenz oder homologe, konservierte Sequenzbereiche auf DNA oder Aminosäureebene identifiziert werden. Diese können als Hybridisierungs-sonde sowie Standard-Hybridisierungstechniken (wie z.B. beschrieben in Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989) zur Isolierung weiterer im Verfahren nützlicher Nukleinsäuresequenzen verwendet werden. Überdies lässt sich ein Nukleinsäuremolekül, umfassend eine vollständige Sequenz der SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID

NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID  
 NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID  
 NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID  
 NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID  
 5 NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ  
 ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137,  
 SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 oder SEQ ID  
 NO: 201 oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion isolieren, wobei  
 Oligonukleotidprimer, die auf der Basis dieser Sequenz oder von Teilen davon,  
 10 verwendet werden (z.B. kann ein Nukleinsäuremolekül, umfassend die vollständigen  
 Sequenz oder einen Teil davon, durch Polymerasekettenreaktion unter Verwendung  
 von Oligonukleotidprimern isoliert werden, die auf der Basis dieser gleichen Sequenz  
 erstellt worden sind). Zum Beispiel lässt sich mRNA aus Zellen isolieren (z.B. durch  
 das Guanidiniumthiocyanat-Extraktionsverfahren von Chirgwin et al. (1979) Bioche-  
 15 mistry 18:5294-5299) und cDNA mittels Reverser Transkriptase (z.B. Moloney-MLV-  
 Reverse-Transkriptase, erhältlich von Gibco/BRL, Bethesda, MD, oder AMV-Reverse-  
 Transkriptase, erhältlich von Seikagaku America, Inc., St. Petersburg, FL) herstellen.  
 Synthetische Oligonukleotidprimer zur Amplifizierung mittels Polymerasekettenreaktion  
 lassen sich auf der Basis einer der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5,  
 20 SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ  
 ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID  
 NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID  
 NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID  
 NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID  
 25 NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID  
 NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID  
 NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID  
 NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID  
 NO: 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ  
 30 ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 183,  
 SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 oder SEQ ID NO: 201 gezeigten  
 Sequenzen oder Mithilfe der in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID  
 NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO:  
 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28,  
 35 SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38,  
 SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48,  
 SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62,  
 SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72,  
 SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82,  
 40 SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94,  
 SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104,  
 SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO:  
 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 184, SEQ ID  
 NO: 194, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 200 oder SEQ ID NO: 202 dargestellten  
 45 Aminosäuresequenzen erstellen. Eine der vorgenannten Nukleinsäuren kann unter

- Verwendung von cDNA oder alternativ von genomischer DNA als Matrize und geeigneten Oligonukleotidprimern gemäß Standard-PCR-Amplifikationstechniken amplifiziert werden. Die so amplifizierte Nukleinsäure kann in einen geeigneten Vektor kloniert werden und mittels DNA-Sequenzanalyse charakterisiert werden. Oligonukleotide, die einer Desaturase-Nukleotidsequenz entsprechen, können durch Standard-Syntheseverfahren, beispielsweise mit einem automatischen DNA-Synthesegerät, hergestellt werden.

- Homologe der verwendeten  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Nukleinsäuresequenzen mit der Sequenz SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 oder SEQ ID NO: 201 bedeutet beispielsweise allelische Varianten mit mindestens etwa 50 oder 60 %, vorzugsweise mindestens etwa 60 oder 70 %, stärker bevorzugt mindestens etwa 70 oder 80 %, 90 % oder 95 % und noch stärker bevorzugt mindestens etwa 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % oder mehr Identität bzw. Homologie zu einer in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 oder SEQ ID NO: 201 gezeigten Nukleotidsequenzen oder ihren Homologen, Derivaten oder Analoga oder Teilen davon. Weiterhin sind isolierte Nukleinsäuremoleküle einer Nukleotidsequenz, die an eine der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID

NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 oder SEQ ID NO: 201 gezeigten Nukleotidsequenzen oder einen Teil davon hybridisieren, z.B. unter stringenten Bedingungen hybridisiert. Unter einem Teil gemäß der Erfindung ist dabei zu verstehen, dass mindestens 25 Basenpaare (= bp), 50 bp, 75 bp, 100 bp, 125 bp oder 150 bp, bevorzugt mindestens 175 bp, 200 bp, 225 bp, 250 bp, 275 bp oder 300 bp, besonders bevorzugt 350 bp, 400 bp, 450 bp, 500 bp oder mehr Basenpaare für die Hybridisierung verwendet werden. Es kann auch vorteilhaft die Gesamtsequenz verwendet werden. Allelische Varianten umfassen insbesondere funktionelle Varianten, die sich durch Deletion, Insertion oder Substitution von Nukleotiden aus/in der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 oder SEQ ID NO: 201 dargestellten Sequenz erhalten lassen, wobei aber die Absicht ist, dass die Enzymaktivität der davon herrührenden synthetisierten Proteine für die Insertion eines oder mehrerer Gene vorteilhafterweise beibehalten wird. Proteine, die noch die enzymatische Aktivität der  $\Delta$ -12-Desaturase,  $\omega$ -3-Desaturase,  $\Delta$ -9-Elongase,  $\Delta$ -6-Desaturase,  $\Delta$ -8-Desaturase,  $\Delta$ -6-Elongase,  $\Delta$ -5-Desaturase,  $\Delta$ -5-Elongase oder  $\Delta$ -4-Desaturase besitzen, das heißt deren Aktivität im wesentlichen nicht reduziert ist, bedeutet Proteine mit mindestens 10 %, vorzugsweise 20 %, besonders bevorzugt 30 %, ganz besonders bevorzugt 40 % der ursprünglichen Enzymaktivität, verglichen mit dem durch SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID

NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 oder SEQ ID NO: 201 kodierten Protein. Die Homologie wurde über den gesamten Aminosäure- bzw. Nukleinsäuresequenzbereich berechnet. Für das Vergleichen verschiedener Sequenzen stehen dem Fachmann eine Reihe von Programmen, die auf verschiedenen Algorithmen beruhen zur Verfügung. Dabei liefern die Algorithmen von Needleman und Wunsch oder Smith und Waterman besonders zuverlässige Ergebnisse. Für die Sequenzvergleiche wurde das Programm PileUp verwendet (J. Mol. Evolution., 25, 351-360, 1987, Higgins et al., CABIOS, 5 1989: 151-153) oder die Programme Gap und BestFit [Needleman and Wunsch (J. Mol. Biol. 48; 443-453 (1970) und Smith and Waterman (Adv. Appl. Math. 2; 482-489 (1981)), die im GCG Software-Paket [Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wisconsin, USA 53711 (1991)] enthalten sind. Die oben in Prozent angegebenen Sequenzhomologiewerte wurden mit dem Programm GAP über den gesamten Sequenzbereich mit folgenden Einstellungen ermittelt: Gap Weight: 50, Length Weight: 3, Average Match: 10.000 und Average Mismatch: 0.000. Die falls nicht anders angegeben als Standardeinstellungen immer für Sequenzvergleiche verwendet wurden.

Homologen der vorgenannten Nukleinsäuresequenzen bedeuten beispielsweise auch bakterielle, Pilz- und Pflanzenhomologen, verkürzte Sequenzen, einzelsträngige DNA oder RNA der kodierenden und nicht-kodierenden DNA-Sequenz oder auch Derivate, wie beispielsweise Promotorvarianten. Die Promotoren stromaufwärts der angegebenen Nukleotidsequenzen können durch einen oder mehrere Nukleotidaustausche, durch Insertion(en) und/oder Deletion(en) modifiziert werden, ohne dass jedoch die Funktionalität oder Aktivität der Promotoren gestört wird. Es ist weiterhin möglich, dass die Aktivität der Promotoren durch Modifikation ihrer Sequenz erhöht ist oder dass sie vollständig durch aktivere Promotoren, sogar aus heterologen Organismen, ersetzt werden.

Die vorgenannten Nukleinsäuren und Proteinmoleküle mit  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\omega$ -3-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- und/oder  $\Delta$ -4-Desaturase-Aktivität, die am Stoffwechsel von Lipiden und Fettsäuren, PUFA-Cofaktoren und Enzymen oder am Transport lipophiler Verbindungen über Membranen beteiligt sind, werden im erfindungsgemäßen Verfahren zur Modulation der Produktion von PUFAs in transgenen Pflanzen, wie Mais, Weizen, Roggen, Hafer, Triticale, Reis, Gerste, Sojabohne, Erdnuss, Baumwolle, Linum Arten wie Öl- oder Faserlein, Brassica-Arten, wie Raps, Canola, Sareptasenf und Rübsen, Pfeffer, Sonnenblume, Borretsch, Nachtkerze und Tagetes, Solanacaen-Pflanzen, wie Kartoffel, Tabak, Aubergine und Tomate, Vicia-Arten, Erbse, Maniok, Alfalfa, Buschpflanzen (Kaffee, Kakao, Tee), Salix-Arten, Bäume (Ölpalme, Kokosnuss) und ausdauernden Gräsern und Futterfeldfrüchten, entweder direkt (z.B. wenn



die Überexpression oder Optimierung eines Fettsäurebiosynthese-Proteins einen direkten Einfluss auf die Ausbeute, Produktion und/oder Effizienz der Produktion der Fettsäure aus modifizierten Organismen hat) verwendet und/oder können eine indirekt  
Auswirkung haben, die dennoch zu einer Steigerung der Ausbeute, Produktion  
5 und/oder Effizienz der Produktion der PUFAs oder einer Abnahme unerwünschter  
Verbindungen führt (z.B. wenn die Modulation des Stoffwechsels von Lipiden und  
Fettsäuren, Cofaktoren und Enzymen zu Veränderungen der Ausbeute, Produktion  
und/oder Effizienz der Produktion oder der Zusammensetzung der gewünschten  
Verbindungen innerhalb der Zellen führt, was wiederum die Produktion einer oder  
10 mehrerer Fettsäuren beeinflussen kann).

Besonders zur Herstellung von PUFAs, bevorzugt von Arachidonsäure, Eicosapen-  
taensäure oder Docosahexaensäure, eignen sich Brassicaceen, Boraginaceen,  
Primulaceen, oder Linaceen. Besonders geeignet zur Herstellung von PUFAs mit den  
erfindungsgemäßen Nukleinsäuresequenzen, vorteilhaft, wie beschrieben, in Kombina-  
15 tion mit weiteren Desaturasen und Elongasen, sind Sareptasenf (*Brassica juncea*),  
Raps und Camelina sativa.

Die Kombination verschiedener Vorläufermoleküle und Biosyntheseenzyme führt zur  
Herstellung verschiedener Fettsäuremoleküle, was eine entscheidende Auswirkung auf  
die Zusammensetzung der Lipide hat. Da mehrfach ungesättigte Fettsäuren (= PUFAs)  
20 nicht nur einfach in Triacylglycerin sondern auch in Membranlipide eingebaut werden.

Besonders zur Herstellung von PUFAs, beispielsweise Stearidonsäure, Eicosapen-  
taensäure und Docosahexaensäure eignen sich Brasicaceae, Boraginaceen, Primula-  
ceen, oder Linaceen. Besonders vorteilhaft eignet sich Lein (*Linum usitatissimum*),  
Brassica juncea und Camelina sativa zur Herstellung von PUFAS mit dem erfindungs-  
25 gemäßen Nukleinsäuresequenzen vorteilhaft, wie beschrieben, in Kombination mit  
weiteren Desaturasen und Elongasen.

Die Lipidsynthese lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: die Synthese von Fettsäu-  
ren und ihre Bindung an sn-Glycerin-3-Phosphat sowie die Addition oder Modifikation  
einer polaren Kopfgruppe. Übliche Lipide, die in Membranen verwendet werden,  
30 umfassen Phospholipide, Glycolipide, Sphingolipide und Phosphoglyceride. Die  
Fettsäuresynthese beginnt mit der Umwandlung von Acetyl-CoA in Malonyl-CoA durch  
die Acetyl-CoA-Carboxylase oder in Acetyl-ACP durch die Acetyltransacylase. Nach  
einer Kondensationsreaktion bilden diese beiden Produktmoleküle zusammen Aceto-  
acetyl-ACP, das über eine Reihe von Kondensations-, Reduktions- und Dehydratisie-  
35 rungsreaktionen umgewandelt wird, so dass ein gesättigtes Fettsäuremolekül mit der  
gewünschten Kettenlänge erhalten wird. Die Produktion der ungesättigten Fettsäuren  
aus diesen Molekülen wird durch spezifische Desaturasen katalysiert, und zwar  
entweder aerob mittels molekularem Sauerstoff oder anaerob (bezüglich der Fett-  
säuresynthese in Mikroorganismen siehe F.C. Neidhardt et al. (1996) *E. coli* und  
40 *Salmonella*. ASM Press: Washington, D.C., S. 612-636 und darin enthaltene Literatur-  
stellen; Lengeler et al. (Hrsgb.) (1999) *Biology of Procaryotes*. Thieme: Stuttgart, New

- York, und die enthaltene Literaturstellen, sowie Magnuson, K., et al. (1993) Microbiological Reviews 57:522-542 und die enthaltenen Literaturstellen). Die so hergestellten an Phospholipide gebundenen Fettsäuren müssen anschließend wieder für die weitere Elongationen aus den Phospholipiden in den FettsäureCoA-Ester-Pool überführt werden. Dies ermöglichen Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferasen. Weiterhin können diese Enzyme die elongierten Fettsäuren wieder von den CoA-Estern auf die Phospholipide übertragen. Diese Reaktionsabfolge kann gegebenenfalls mehrfach durchlaufen werden.
- 5 Vorläufer für die PUFA-Biosynthese sind beispielsweise Ölsäure, Linol- und Linolensäure. Diese C<sub>18</sub>-Kohlenstoff-Fettsäuren müssen auf C<sub>20</sub> und C<sub>22</sub> verlängert werden, damit Fettsäuren vom Eicosa- und Docosa-Kettentyp erhalten werden. Mithilfe der im Verfahren verwendeten Desaturasen wie der Δ-12-, ω3-, Δ-4-, Δ-5-, Δ-6- und Δ-8-Desaturasen und/oder der Δ-5-, Δ-6-, Δ-9-Elongasen können Arachidonsäure, Eicosapentaensäure, Docosapentaensäure oder Docosahexaensäure vorteilhaft
- 10 Eicosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure hergestellt werden und anschließend für verschiedene Zwecke bei Nahrungsmittel-, Futter-, Kosmetik- oder pharmazeutischen Anwendungen verwendet werden. Mit den genannten Enzymen können C<sub>20</sub>- und/oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei vorteilhaft mindestens drei, vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäuremolekül, vorzugsweise C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-
- 15 Fettsäuren mit vorteilhaft vier, fünf oder sechs Doppelbindungen im Fettsäuremolekül hergestellt werden. Die Desaturierung kann vor oder nach Elongation der entsprechenden Fettsäure erfolgen. Daher führen die Produkte der Desaturaseaktivitäten und der möglichen weiteren Desaturierung und Elongation zu bevorzugten PUFAs mit höherem Desaturierungsgrad, einschließlich einer weiteren Elongation von C<sub>20</sub> zu C<sub>22</sub>-
- 20 Fettsäuren, zu Fettsäuren wie γ-Linolensäure, Dihomo-γ-linolensäure, Arachidonsäure, Stearidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure. Substrate der verwendeten Desaturasen und Elongasen im erfindungsgemäßen Verfahren sind C<sub>16</sub>-, C<sub>18</sub>- oder C<sub>20</sub>-Fettsäuren wie zum Beispiel Linolsäure, γ-Linolensäure, α-Linolensäure, Dihomo-γ-linolensäure, Eicosatetraensäure oder Stearidonsäure. Bevorzugte Substrate sind Linolsäure, γ-Linolensäure und/oder α-Linolensäure, Dihomo-γ-linolensäure
- 25 bzw. Arachidonsäure, Eicosatetraensäure oder Eicosapentaensäure. Die synthetisierten C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Fettsäuren mit mindestens zwei, drei, vier, fünf oder sechs, vorteilhaft mit mindestens vier, fünf oder sechs Doppelbindungen in der Fettsäure fallen im erfindungsgemäßen Verfahren in Form der freien Fettsäure oder in Form ihrer Ester
- 30 beispielsweise in Form ihrer Glyceride an.

- Unter dem Begriff "Glycerid" wird ein mit ein, zwei oder drei Carbonsäureresten verestertes Glycerin verstanden (Mono-, Di- oder Triglycerid). Unter "Glycerid" wird auch ein Gemisch an verschiedenen Glyceriden verstanden. Das Glycerid oder das Glyceridgemisch kann weitere Zusätze, z.B. freie Fettsäuren, Antioxidantien, Proteine,
- 40 Kohlenhydrate, Vitamine und/oder andere Substanzen enthalten.

Unter einem "Glycerid" im Sinne des erfindungsgemäßen Verfahrens werden ferner vom Glycerin abgeleitete Derivate verstanden. Dazu zählen neben den oben beschrie-

benen Fettsäureglyceriden auch Glycerophospholipide und Glyceroglycolipide. Bevorzugt seien hier die Glycerophospholipide wie Lecithin (Phosphatidylcholin), Cardiolipin, Phosphatidylglycerin, Phosphatidylserin und Alkylacylglycerophospholipide beispielhaft genannt.

- 5 Ferner müssen Fettsäuren anschließend an verschiedene Modifikationsorte transportiert und in das Triacylglycerin-Speicherlipid eingebaut werden. Ein weiterer wichtiger Schritt bei der Lipidsynthese ist der Transfer von Fettsäuren auf die polaren Kopfgruppen, beispielsweise durch Glycerin-Fettsäure-Acyltransferase (siehe Frentzen, 1998, Lipid, 100(4-5):161-166).
- 10 Veröffentlichungen über die Pflanzen-Fettsäurebiosynthese, Desaturierung, den Lipidstoffwechsel und Membrantransport von fetthaltigen Verbindungen, die Betaoxidation, Fettsäuremodifikation und Cofaktoren, Triacylglycerin-Speicherung und -Assemblierung einschließlich der Literaturstellen darin siehe in den folgenden Artikeln: Kinney, 1997, Genetic Engineering, Hrsgb.: JK Setlow, 19:149-166; Ohlrogge und
- 15 Browse, 1995, Plant Cell 7:957-970; Shanklin und Cahoon, 1998, Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 49:611-641; Voelker, 1996, Genetic Engineering, Hrsgb.: JK Setlow, 18:111-13; Gerhardt, 1992, Prog. Lipid R. 31:397-417; Gühnemann-Schäfer & Kindl, 1995, Biochim. Biophys Acta 1256:181-186; Kunau et al., 1995, Prog. Lipid Res. 34:267-342; Stymne et al., 1993, in: Biochemistry and Molecular Biology of Membrane
- 20 and Storage Lipids of Plants, Hrsgb.: Murata und Somerville, Rockville, American Society of Plant Physiologists, 150-158, Murphy & Ross 1998, Plant Journal. 13(1):1-16.

- Die im Verfahren hergestellten PUFAs, umfassen eine Gruppe von Molekülen, die höhere Tiere nicht mehr synthetisieren können und somit aufnehmen müssen oder die
- 25 höhere Tiere nicht mehr ausreichend selbst herstellen können und somit zusätzlich aufnehmen müssen, obwohl sie leicht von anderen Organismen, wie Bakterien, synthetisiert werden, beispielsweise können Katzen Arachidonsäure nicht mehr synthetisieren.

- Unter Phospholipiden im Sinne der Erfindung sind zu verstehen Phosphatidylcholin,
- 30 Phosphatidylethanolamin, Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerin und/oder Phosphatidylinositol vorteilhafterweise Phosphatidylcholin.

- Die Begriffe "Produktion" oder "Produktivität" sind im Fachgebiet bekannt und beinhalten die Konzentration des Fermentationsproduktes (Verbindungen der Formel I), das in einer bestimmten Zeitspanne und einem bestimmten Fermentationsvolumen gebildet
- 35 wird (z.B. kg Produkt pro Stunde pro Liter). Sie umfassen auch die Produktivität innerhalb einer Pflanzenzelle oder einer Pflanze, das heißt den Gehalt an den gewünschten im Verfahren hergestellten Fettsäuren bezogen auf den Gehalt an allen Fettsäuren in dieser Zelle oder Pflanze. Der Begriff Effizienz der Produktion umfasst die Zeit, die zur Erzielung einer bestimmten Produktionsmenge nötig ist (z.B. wie lange
- 40 die Zelle zur Aufrichtung einer bestimmten Durchsatzrate einer Feinchemikalie benötigt). Der Begriff "Ausbeute" oder "Produkt/Kohlenstoff-Ausbeute" ist im Fachge-

biet bekannt und umfasst die Effizienz der Umwandlung der Kohlenstoffquelle in das Produkt (d.h. die Feinchemikalie). Dies wird gewöhnlich beispielsweise ausgedrückt als kg Produkt pro kg Kohlenstoffquelle. Durch Erhöhen der Ausbeute oder Produktion der Verbindung wird die Menge der gewonnenen Moleküle oder der geeigneten gewonnenen Moleküle dieser Verbindung in einer bestimmten Kulturmenge über einen festgelegten Zeitraum erhöht.

Die Begriffe "Biosynthese" oder "Biosyntheseweg" sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Synthese einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle aus Zwischenverbindungen, beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess.

Die Begriffe "Abbau" oder "Abbauweg" sind im Fachgebiet bekannt und umfassen die Spaltung einer Verbindung, vorzugsweise einer organischen Verbindung, durch eine Zelle in Abbauprodukte (allgemeiner gesagt, kleinere oder weniger komplexe Moleküle) beispielsweise in einem Mehrschritt- und stark regulierten Prozess.

Der Begriff "Stoffwechsel" ist im Fachgebiet bekannt und umfasst die Gesamtheit der biochemischen Reaktionen, die in einem Organismus stattfinden. Der Stoffwechsel einer bestimmten Verbindung (z.B. der Stoffwechsel einer Fettsäure) umfasst dann die Gesamtheit der Biosynthese-, Modifikations- und Abbauwege dieser Verbindung in der Zelle, die diese Verbindung betreffen.

Diese Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele weiter veranschaulicht, die nicht als beschränkend aufgefasst werden sollten. Der Inhalt sämtlicher in dieser Patentanmeldung zitierten Literaturstellen, Patentanmeldungen, Patente und veröffentlichten Patentanmeldungen ist hier durch Bezugnahme aufgenommen.

#### Beispiele

Beispiel 1: Allgemeine Klonierungsverfahren:

Die Klonierungsverfahren wie z.B. Restriktionsspaltungen, Agarose-Gelelektrophorese, Reinigung von DNA-Fragmenten, Transfer von Nukleinsäuren auf Nitrozellulose und Nylon Membranen, Verknüpfen von DNA-Fragmenten, Transformation von *Escherichia coli* Zellen, Anzucht von Bakterien und die Sequenzanalyse rekombinanter DNA wurden wie bei Sambrook et al. (1989) (Cold Spring Harbor Laboratory Press: ISBN 0-87969-309-6) beschrieben durchgeführt.

Beispiel 2: Sequenzanalyse rekombinanter DNA:

Die Sequenzierung rekombinanter DNA-Moleküle erfolgte mit einem Laserfluoreszenz-DNA-Sequenzierer der Firma ABI nach der Methode von Sanger (Sanger et al. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 5463-5467). Fragmente resultierend aus einer Polymerase Kettenreaktion wurden zur Vermeidung von Polymerasefehlern in zu exprimierenden Konstrukten sequenziert und überprüft.

Beispiel 3: Klonierung von Genen aus *Oncorhynchus mykiss*

Durch Suche nach konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen entsprechend der in der Anmeldung aufgeführten Elongase-Gene wurden zwei Sequenzen mit entsprechenden Motiven in der Sequenzdatenbank von Genbank identifiziert.

Gen-Name	Genbank No	Aminosäuren
OmELO2	CA385234, CA364848, CA366480	264
OmELO3	CA360014, CA350786	295

- 5 Gesamt-RNA von *Oncorhynchus mykiss* wurde mit Hilfe des RNAeasy Kits der Firma Qiagen (Valencia, CA, US) isoliert. Aus der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von oligo-dT-Cellulose poly-A+ RNA (mRNA) isoliert (Sambrook et al., 1989). Die RNA wurde mit dem Reverse Transcription System Kit von Promega revers transkribiert und die synthetisierte cDNA in den lambda ZAP Vektor (lambda ZAP Gold, Stratagene)
- 10 kloniert. Entsprechend Herstellerangaben wurde die cDNA zur Plasmid-DNA entpackt. Die cDNA-Plasmid-Bank wurde dann für die PCR zur Klonierung von Expressionsplasmiden verwendet.

## Beispiel 4: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in Hefen

- 15 Für die Klonierung der zwei Sequenzen zur heterologen Expression in Hefen wurden folgende Oligonukleotide für die PCR-Reaktion verwendet:

Primer	Nukleotidsequenz
5' f* OmELO2	5' aagcttacataatggcttcaacatggcaa (SEQ ID NO: 179)
3' r* OmELO2	5' ggatccttatgtcttcttgctcttctgtt (SEQ ID NO: 180)
5' f OmELO3	5' aagcttacataatggagactttta (SEQ ID NO: 181)
3' r OmELO3	5' ggatccttcagtcctccctcactttcc (SEQ ID NO: 182)

\* f: forward, r: reverse

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

- 5,00 µL Template cDNA
- 5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 20 5,00 µL 2mM dNTP
- 1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)
- 0,50 µL Advantage-Polymerase
- Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

## Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

5 Anzahl der Zyklen: 35

Das PCR Produkt wurde für 2 h bei 37 °C mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI inkubiert. Der Hefe-Expressionsvektor pYES3 (Invitrogen) wurde in gleicherweise inkubiert. Anschliessend wurde das 812 bp bzw. 905 bp große PCR Produkt sowie der Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschliessend wurden Vektor und Elongase cDNA ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide pYES3-OmELO2 und pYES3-OmELO3 wurden durch Sequenzierung verifiziert und in den Saccharomyces Stamm INVSc1 (Invitrogen) durch Elektroporation (1500 V) transformiert. Zur Kontrolle wurde pYES3 parallel transformiert. Anschliessend wurden die Hefen auf Komplett-Minimalmedium ohne Tryptophan mit 2 % Glucose ausplattiert. Zellen, die auf ohne Tryptophan im Medium wachstumsfähig waren, enthalten damit die entsprechenden Plasmide pYES3, pYES3-OmELO2 (SEQ ID NO: 51) und pYES3-OmELO3 (SEQ ID NO: 53). Nach der Selektion wurden je zwei Transformaten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

Beispiel 5: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

Für die Transformation von Pflanzen wurde ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu wurde mit folgendem Primerpaar NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende des kodierenden Sequenz eingefügt:

## PSUN-OmELO2

Forward: 5'-GCGGCCGCGCATAATGGCTTCAACATGGCAA (SEQ ID NO: 175)

Reverse: 3'-GCGGCCGCTTATGTCTTCTTGCTCTTCCTGTT (SEQ ID NO: 176)

## PSUN-OMELO3

30 Forward: 5'-GCGGCCGCataatggagactttaat (SEQ ID NO: 177)

Reverse: 3'-GCGGCCGCTcagtcacccctcactttcc (SEQ ID NO: 178)

## Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

5,00 µL Template cDNA

35 5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00 µL 2mM dNTP

1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)

0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

## Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

5 Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte wurden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wurde in gleicherweise inkubiert. Anschliessend wurde die PCR Produkte sowie der 7624 bp große Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente  
10 ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschliessend wurden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide pSUN-OmELO2 und pSUN-OmELO3 wurde durch Sequenzierung verifiziert.

pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P.,  
15 (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Mol Biol 25:989-994). pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des Octopinsynthase-Gens aus dem A. tumefaciens Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P.,  
20 Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid-encoded octopine synthase gene J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 499-511 (1982) Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1-684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das  
25 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standard-primer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert. (Primersequenz: 5'-GTGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC GGATCTGCTGGCTATGAA-3', SEQ ID NO: 174). Das PCR-Fragment wurde mit  
30 EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von Arabidopsis thaliana, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

## Beispiel 6: Lipidextraktion aus Hefen und Samen:

Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen, Pilzen, Algen, Ciliaten oder  
35 auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierten Mikroorganismen oder die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet werden und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. von Lipiden oder einer Fettsäure) untersucht wird. Diese  
40 Analysetechniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und

mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (siehe beispielsweise Ullman, Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Bd. 17; Rehm et al. (1993) Biotechnology, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469-714, VCH: Weinheim; Belter, P.A., et al. (1988) Bioseparations: downstream processing for Biotechnology, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., und Cabral, J.M.S. (1992) Recovery processes for biological Materials, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J.D. (1988) Biochemical Separations, in: Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989) Separation and purification techniques in biotechnology, Noyes Publications).

Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96 (22):12935-12940, und Browse et al. (1986) Analytic Biochemistry 152:141-145, beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben bei Christie, William W., Advances in Lipid Methodology, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamteffizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker, Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschichtchromatographie).

Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie,



Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).

Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 Mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min und 5 min bei 240°C unterworfen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden.

Pflanzenmaterial wird zunächst mechanisch durch Mörsern homogenisiert, um es einer Extraktion zugänglicher zu machen.

Dann wird 10 min auf 100°C erhitzt und nach dem Abkühlen auf Eis erneut sedimentiert. Das Zellsediment wird mit 1 M methanolischer Schwefelsäure und 2 % Dimethoxypropan 1 h bei 90°C hydrolysiert und die Lipide transmethyliert. Die resultierenden Fettsäuremethylester (FAME) werden in Petrolether extrahiert. Die extrahierten FAME werden durch Gasflüssigkeitschromatographie mit einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0,32 mm) und einem Temperaturgradienten von 170°C auf 240°C in 20 min und 5 min bei 240°C analysiert. Die Identität der Fettsäuremethylester wird durch Vergleich mit entsprechenden FAME-Standards (Sigma) bestätigt. Die Identität und die Position der Doppelbindung kann durch geeignete chemische Derivatisierung der FAME-Gemische z.B. zu 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998) mittels GC-MS weiter analysiert werden.

Hefen, die wie unter Beispiel 4 mit den Plasmiden pYES3, pYES3-OmELO2 und pYES3-OmELO3 transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 10 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-

Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert.

- 5 Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma).

Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

- 10 Beispiel 7: Funktionelle Charakterisierung von OmELO2 und OmELO3:

- OmELO2 zeigt keine Elongase-Aktivität, während für OmELO3 eine deutliche Aktivität mit verschiedenen Substraten nachgewiesen werden konnte. Die Substratspezifität der OmElo3 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Figur 2). Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Alle transgene Hefen zeigen die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der OmElo3-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen OmElo3 funktional exprimiert werden konnte.
- 15

- Figur 2 zeigt, dass die OmElo3 eine Substratspezifität aufweist, die mit hoher Spezifität zur Verlängerung von  $\Delta 5$ - und  $\Delta 6$ -Fettsäuren mit einer  $\omega 3$ -Doppelbindung führt. Es konnte in geringerer Spezifität des weiteren auch  $\omega 6$ -Fettsäuren (C18 und C20) elongiert werden. Stearidonsäure (C18:4  $\omega 3$ ) und Eicosapentaensäure (C20:5  $\omega 3$ ) stellen die besten Substrate für die OmElo3 dar (bis zu 66 % Elongation).
- 20

#### Beispiel 8: Rekonstitution der Synthese von DHA in Hefe

- Die Rekonstitution der Biosynthese von DHA (22:6  $\omega 3$ ) wurde ausgehend von EPA (20:5  $\omega 3$ ) bzw. Stearidonsäure (18:4  $\omega 3$ ) durch die Coexpression der OmElo3 mit der  $\Delta 4$ -Desaturase aus *Euglena gracilis* bzw. der  $\Delta 5$ -Desaturase aus *Phaeodactylum tricornutum* und der  $\Delta 4$ -Desaturase aus *Euglena gracilis* durchgeführt. Dazu wurden weiterhin die Expressionsvektoren pYes2-EgD4 und pESCLEu-PtD5 konstruiert. Der o.g. Hefestamm, der bereits mit dem pYes3-OmElo3 (SEQ ID NO: 55) transformiert ist, wurde weiter mit dem pYes2-EgD4 bzw. gleichzeitig mit pYes2-EgD4 und pESCLEu-PtD5 transformiert. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgte auf Komplet-Minimalmedium-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Tryptophan und Uracil im Falle des pYes3-OmELO/pYes2-EgD4-Stammes und ohne Tryptophan, Uracil und Leucin im Falle des pYes3-OmELO/pYes2-EgD4+pESCLEu-PtD5-Stammes. Die Expression wurde wie oben angegeben durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen wurden für weitere 120 h bei 15°C inkubiert.
- 25
- 30
- 35

Figur 3 zeigt die Fettsäureprofile von transgenen Hefen, die mit 20:5  $\omega 3$  gefüttert wurden. In der Kontroll-Hefe (A), die mit dem pYes3-OmElo3-Vektor und dem leeren

Vektor pYes2 transformiert wurden, wurde 20:5  $\omega$ 3 sehr effizient zu 22:5  $\omega$ 3 elongiert (65% Elongation). Die zusätzliche Einführung der Eg $\Delta$ -4-Desaturase führte zu der Umsetzung von 22:5  $\omega$ 3 zu 22:6  $\omega$ 3 (DHA). Die Fettsäure-Zusammensetzung der transgenen Hefen ist in Figur 5 wiedergegeben. Nach der Co-Expression von OmElo3 und EgD4 konnte bis zu 3% DHA in Hefen nachgewiesen werden.

In einem weiteren Co-Expressionsexperiment wurden OmElo3, EgD4 und eine  $\Delta$ 5-Desaturase aus *P. tricornutum* (PtD5) zusammen exprimiert. Die transgenen Hefen wurden mit Stearidonsäure (18:4  $\omega$ 3) gefüttert und analysiert (Figur 4). Die Fettsäure-Zusammensetzung dieser Hefen ist in Figur 5 aufgeführt. Durch OmElo3 wurde die gefütterte Fettsäure 18:4  $\omega$ 3 zu 20:4  $\omega$ 3 elongiert (60% Elongation). Letztere wurde durch die PtD5 zu 20:5  $\omega$ 3 desaturiert. Die Aktivität der PtD5 betrug 15%. 20:5  $\omega$ 3 konnte weiterhin durch die OmElo3 zu 22:5  $\omega$ 3 elongiert werden. Im Anschluß wurde die neu synthetisierte 22:5  $\omega$ 3 zu 22:6  $\omega$ 3 (DHA) desaturiert. In diesen Experimenten konnte bis zu 0,7% DHA erzielt werden.

Aus diesen Experimenten geht hervor, dass die in dieser Erfindung verwendeten Sequenzen OmElo3, EgD4 und PtD5 für die Produktion von DHA in eukaryotischen Zellen geeignet sind.

#### Beispiel 9: Erzeugung von transgenen Pflanzen

a) Erzeugung transgener Rapspflanzen (verändert nach Moloney et al., 1992, Plant Cell Reports, 8:238-242)

Zur Erzeugung transgener Rapspflanzen können binäre Vektoren in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1:pGV2260 oder *Escherichia coli* genutzt (Deblaere et al, 1984, Nucl. Acids. Res. 13, 4777-4788). Zur Transformation von Rapspflanzen (Var. Drakkar, NPZ Nordeutsche Pflanzenzucht, Hohenlieth, Deutschland), wird eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Murashige und Skoog 1962 Physiol. Plant. 15, 473) mit 3 % Saccharose (3MS-Medium) benutzt. Petiolen oder Hypokotyledonen frisch gekeimter steriler Rapspflanzen (zu je ca. 1 cm<sup>2</sup>) werden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgt eine 3-tägige Colnkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 3MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung wird nach 3 Tagen mit 16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit weitergeführt und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 20 mikromol Benzylaminopurin (BAP) und 1,6 g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse werden auf MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Bilden sich nach drei Wochen keine Wurzeln, so wurde als Wachstumshormon 2-Indolbuttersäure zum Bewurzeln zum Medium gegeben.

Regenerierte Sprosse werden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer oder im Gewächshaus angezogen, zur Blüte gebracht, reife Samen

geerntet und auf Elongase-Expression wie  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität oder  $\omega$ -3-Desaturaseaktivität mittels Lipidanalysen untersucht. Linien mit erhöhten Gehalten an C20- und C22 mehrfachungesättigten Fettsäuren können so identifiziert werden.

## 5 b) Herstellung von transgenen Leinpflanzen

Die Herstellung von transgenen Leinpflanzen können zum Beispiel nach der Methode von Bell et al., 1999, In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant. 35(6):456-465 mittels particle bombardment erzeugt werden. In der Regel wurde eine Agrobakterien-vermittelte Transformation zum Beispiel nach Mlynarova et al. (1994), Plant Cell Report 13: 282-285 zur Leintransformation verwendet.

Beispiel 10: Klonierung von  $\Delta$ 5-Elongase-Genen aus *Thraustochytrium aureum* ATCC34304 und *Thraustochytrium ssp.*

Durch Vergleiche der verschiedenen in dieser Anmeldung gefundenen Elongase-Proteinsequenzen konnten konservierte Nukleinsäurebereiche definiert werden (Histidin-Box: His-Val-X-His-His, Tyrosin-Box: Met-Tyr-X-Tyr-Tyr). Mit Hilfe dieser Sequenzen wurde eine EST-Datenbank von *T. aureum* ATCC34304 und *Thraustochytrium ssp.* nach weiteren  $\Delta$ -5-Elongasen durchsucht. Folgende neue Sequenzen konnten gefunden werden:

Gen-Name	Nukleotide	Aminosäuren
BioTaurELO1	828 bp	275
TL16y2	831	276

Gesamt-RNA von *T. aureum* ATCC34304 und *Thraustochytrium ssp.* wurde mit Hilfe des RNAeasy Kits der Firma Qiagen (Valencia, CA, US) isoliert. Aus der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des PolyATract Isolierungssystems (Promega) mRNA isoliert. Die mRNA wurde mit dem Marathon cDNA Amplification-Kit (BD Biosciences) reverse transkribiert und entsprechend der Herstellerangaben Adaptoren ligiert. Die cDNA-Bank wurde dann für die PCR zur Klonierung von Expressionsplasmiden mittels 5'- und 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) verwendet.

### Beispiel 11: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in Hefen

Für die Klonierung der Sequenz zur heterologen Expression in Hefen wurden folgende Oligonukleotide für die PCR-Reaktion verwendet:

Primer	Nukleotidsequenz
5' f* BioTaurELO1	5' gacataatgacgagcaacatgag (SEQ ID NO: 170)
3' r* BioTaurELO1	5' cggcttaggccgacttggccttggg (SEQ ID NO: 171)
5'f*TL16y2	5' agacataatggacgtcgtcgagcagcaatg (SEQ ID NO: 172)
3'r*TL16y2	5' ttagatggtcttctgcttcttgggcgcc (SEQ ID NO: 173)

5 \* f: forward, r: reverse

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

5,00 µL Template cDNA

5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>

10 5,00 µL 2mM dNTP

1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)

0,50 µL pfu-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurde eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

15 Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

20 Die PCR Produkte BioTaurELO1 (siehe SEQ ID NO: 65) und TL16y2 (siehe SEQ ID NO: 83) wurde für 30 min bei 21 °C mit dem Hefe-Expressionsvektor pYES2.1-TOPO (Invitrogen) inkubiert gemäss Herstellerangaben. Das PCR-Produkt wird dabei durch einen T-Überhang und Aktivität einer Topoisomerase (Invitrogen) in den Vektor ligiert.

Nach der Inkubation erfolgte dann die Transformation von E. coli DH5α Zellen.

Entsprechende Klone wurden durch PCR identifiziert, die Plasmid-DNA mittels Qiagen

25 QIAeasy-Kit isoliert und durch Sequenzierung verifiziert. Die korrekte Sequenz wurde dann in den Saccharomyces Stamm INVSc1 (Invitrogen) durch Elektroporation (1500 V) transformiert. Zur Kontrolle wurde der leere Vektor pYES2.1 parallel transformiert.

Anschließend wurden die Hefen auf Komplett-Minimalmedium ohne Uracil mit 2 %

Glucose ausplattiert. Zellen, die ohne Uracil im Medium wachstumsfähig waren,

30 enthalten damit die entsprechenden Plasmide pYES2.1, pYES2.1-BioTaurELO1 und pYES2.1-TL16y2. Nach der Selektion wurden je zwei Transformaten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

**Beispiel 12: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen**

- Für die Transformation von Pflanzen wurde ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu wurde mit folgendem Primerpaar NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende des kodierenden Sequenz eingefügt:

**PSUN-BioTaurELO1**

Forward: 5'-GCGGCCGCATAATGACGAGCAACATGAGC (SEQ ID NO: 166)

- 10 Reverse: 3'-GCGGCCGCTTAGGCCGACTTGGCCTTGGG (SEQ ID NO: 167)

**PSUN-TL16y2**

Forward: 5'-GCGGCCGCACCATGGACGTCGTCGAGCAGCAATG (SEQ ID NO: 168)

- 15 Reverse: 5'-GCGGCCGCTTAGATGGTCTTCTGCTTCTTGGGCGCC  
(SEQ ID NO: 169)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

5,00 µL Template cDNA

5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00 µL 2mM dNTP

- 20 1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)

0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

- 25 Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

- 30 Die PCR Produkte wurden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wurde in gleicherweise inkubiert. Anschliessend wurde die PCR Produkte sowie der 7624 bp große Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolge mittels Qiagen Gel Purification Kit
- 35 gemäss Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide pSUN-BioTaurELO1 und pSUN-TL16y2 wurden durch Sequenzierung verifiziert.

- pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Mol Biol 25:989-994). pSUN-USP entstand aus pSUN300,
- 40

indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des Octopinsynthase-Gens aus dem *A. tumefaciens* Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (6), 499-511 (1982) Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1-684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standard-primer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert. (Primersequenz: 5'-GTGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC GGATCTGCTGGCTATGAA-3', SEQ ID NO: 165). Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

Die Lipidextraktion aus Hefen und Samen erfolgte identisch zu Beispiel 6.

#### Beispiel 13: Funktionelle Charakterisierung von BioTaurELO1 und TL16y2:

Die Substratspezifität der BioTaurELO1 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Figur 6). Figur 6 zeigt die Fütterungsexperimente zur Bestimmung der Funktionalität und Substratspezifität mit Hefestämmen, die entweder den Vektor pYes2.1 (Kontrolle = Control) oder den Vektor pYes2.1-BioTaurELO1 (= BioTaur) mit der  $\Delta$ -5-Elongase enthalten. In beiden Ansätzen wurde 200  $\mu$ M  $\gamma$ -Linolensäure und Eicosapentaensäure dem Hefeinkubationsmedium zugesetzt und 24 h inkubiert. Nach Extraktion der Fettsäuren aus den Hefen wurden diese transmethyliert und gaschromatographisch aufgetrennt. Die aus den beiden gefütterten Fettsäuren entstandenen Elongationsprodukte sind durch Pfeile markiert.

Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Alle transgene Hefen zeigen die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der BioTaurELO1-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen BioTaurELO1 funktional exprimiert werden konnte.

Figur 6 zeigt, dass die BioTaurELO1 eine Substratspezifität aufweist, die mit hoher Spezifität zur Verlängerung von  $\Delta$ 5- und  $\Delta$ 6-Fettsäuren mit einer  $\omega$ 3-Doppelbindung führt. Des weiteren konnten auch  $\omega$ 6-Fettsäuren (C18 und C20) elongiert werden. Es werden  $\gamma$ -Linolensäure (C18:3  $\omega$ 6) mit 65,28 %, Stearidonsäure (C18:4  $\omega$ 3) mit 65,66 % und Eicosapentaensäure (C20:5  $\omega$ 3) mit 22,01 % Konversion umgesetzt. Die Substratspezifitäten der verschiedenen Fütterungsexperimente sind in Tabelle 6 dargestellt (siehe am Ende der Beschreibung).

Die Konversionsrate von GLA bei Fütterung von GLA und EPA betrug 65,28 %. Die Konversionsrate von EPA bei gleicher Fütterung von GLA und EPA betrug 9,99 %.

Wurde nur EPA gefüttert, so betrug die Konversionsrate von EPA 22,01 %. Auch Arachidonsäure (= ARA) wurde bei Fütterung umgesetzt. Die Konversionsrate betrug 14,47 %. Auch Stearidonsäure (= SDA) wurde umgesetzt. In diesem Fall betrug die Konversionsrate 65,66 %.

- 5 Die Funktionalität und Substratspezifität von TL16y2 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden. Tabelle 7 zeigt die Fütterungsexperimente. Die Fütterungsversuche wurden in gleicherweise durchgeführt wie für BioTaurELO1 beschrieben. Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer
- 10 Fettsäuren, den Produkten der TL16y2-Reaktion (Fig. 11). Dies bedeutet, dass das Gen TL16y2 funktional exprimiert werden konnte.

Tabelle 7: Expression von TL16y2 in Hefe.

Flächen der gaschromatographischen Analyse in %									
Plasmid	Fettsäure	C18:3 (n-6)	C18:4 (n-3)	C20:3 (n-6)	C20:4 (n-6)	C20:4 (n-3)	C20:5 (n-3)	C22:4 (n-6)	C22:5 (n-3)
pYES	250 uM EPA						13,79		
TL16y2	250 uM EPA						25,81		2,25
pYES	50 uM EPA						5,07		
TL16y2	50 uM EPA						2,48		1,73
pYES	250 uM GLA	8,31							
TL16y2	250 uM GLA	3,59		10,71					
pYES	250 uM ARA				16,03				
TL16y2	250 uM ARA				15,2		3,87		
pYES	250 uM SDA		26,79			0,35			
TL16y2	250 uM SDA		7,74			29,17			

- 15 Die in Tabelle 7 wiedergegebenen Ergebnisse zeigen mit TL16y2 gegenüber der Kontrolle folgende prozentuale Umsätze: a) % Umsatz EPA (250 uM): 8 %, b) % Umsatz EPA (50 uM): 41 %, c) % Umsatz ARA: 20,3 %, d) % Umsatz SDA: 79, 4% und e) % Umsatz GLA: 74,9 %.



TL16y2 zeigt damit  $\Delta 5$ -,  $\Delta 6$ - und  $\Delta 8$ -Elongaseaktivität. Dabei ist die Aktivität für C18-Fettsäuren mit  $\Delta 6$ -Doppelbindung am höchsten. Abhängig von der Konzentration an gefütterten Fettsäuren werden dann C20-Fettsäuren mit einer  $\Delta 5$ - bzw.  $\Delta 8$ -Doppelbindung verlängert.

#### 5 Beispiel 14: Klonierung von Genen aus *Ostreococcus tauri*

Durch Suche nach konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen mit Hilfe der in der Anmeldung aufgeführten Elongase-Gene mit  $\Delta 5$ -Elongaseaktivität oder  $\Delta 6$ -Elongaseaktivität konnten zwei Sequenzen mit entsprechenden Motiven in einer *Ostreococcus tauri* Sequenzdatenbank (genomische Sequenzen) identifiziert werden.

#### 10 Es handelt sich dabei um die folgenden Sequenzen:

Gen-Name	SEQ ID	Aminosäuren
OtELO1, ( $\Delta 5$ -Elongase)	SEQ ID NO: 67	300
OtELO2, ( $\Delta 6$ -Elongase)	SEQ ID NO: 69	292

OtElo1 weist die höchste Ähnlichkeit zu einer Elongase aus *Danio rerio* auf (GenBank AAN77156; ca. 26 % Identität), während OtElo2 die größte Ähnlichkeit zur *Physcomitrella Elo* (PSE) [ca. 36 % Identität] aufweist (Alignments wurden mit dem tBLASTn-Aalgorithmus (Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990, 215: 403 – 410) durchgeführt.

#### 15 Die Klonierung wurde wie folgt durchgeführt:

40 ml einer *Ostreococcus tauri* Kultur in der stationären Phase wurden abzentrifugiert und in 100  $\mu$ l Aqua bidest resuspendiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Auf der Basis des PCR-Verfahren wurden die zugehörigen genomischen DNAs amplifiziert. Die entsprechenden Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie die Hefe-Konsensus-Sequenz für hocheffiziente Translation (Kozak, Cell 1986, 44:283-292) neben dem Startcodon trugen. Die Amplifizierung der OtElo-DNAs wurde jeweils mit 1  $\mu$ l aufgetauten Zellen, 200  $\mu$ M dNTPs, 2,5 U *Taq*-Polymerase und 100 pmol eines jeden Primers in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: Erste Denaturierung bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei  $94^{\circ}\text{C}$  für 30 Sekunden,  $55^{\circ}\text{C}$  für 1 Minute und  $72^{\circ}\text{C}$  für 2 Minuten sowie ein letzter Verlängerungsschritt bei  $72^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten.

#### Beispiel 15: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in Hefen:

Zur Charakterisierung der Funktion der Elongasen aus *Ostreococcus tauri* wurden die offenen Leserahmen der jeweiligen DNAs stromabwärts des Galactose-induzierbaren GAL1-Promotors von pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) kloniert, wobei pOTE1 und pOTE2 erhalten wurden.

Der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm 334 wurde durch Elektroporation (1500 V) mit dem Vektor pOTE1 bzw. pOTE2 transformiert. Als Kontrolle wurde eine Hefe verwendet, die mit dem leeren Vektor pYES2 transformiert wurde. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgte auf Komplet-Minimalmedium (CMdum)-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Uracil. Nach der Selektion wurden je drei Transformanten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

Für die Expression der Ot-Elongasen wurden zunächst Vorkulturen aus jeweils 5 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2% (w/v) Raffinose aber ohne Uracil mit den ausgewählten Transformanten angeimpft und 2 Tage bei 30°C, 200 rpm inkubiert.

5 ml CMdum-Flüssigmedium (ohne Uracil) mit 2% Raffinose und 300 µM verschiedener Fettsäuren wurden dann mit den Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Die Expression wurde durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen wurden für weitere 96 h bei 20°C inkubiert.

Beispiel 16: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

Für die Transformation von Pflanzen wurde ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu wurden mittels PCR NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenzen eingefügt. Die entsprechenden Primersequenzen wurden von den 5'- und 3-Bereich von OtElo1 und OtElo2 abgeleitet.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

5,00 µL Template cDNA  
5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>  
5,00 µL 2mM dNTP  
1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)  
0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte wurden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wurde in gleicherweise inkubiert.

Anschliessend wurde die PCR Produkte sowie der Vektor durch Agarose-

Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschliessend wurden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide pSUN-OtELO1 und pSUN-OtELO2 wurde durch Sequenzierung verifiziert.

pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* 25:989-994). pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des *Ostreococcus*-Gens aus dem *A. tumefaciens* Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (6), 499-511 (1982). Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1 bis 684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert. (Primersequenz:  
5'-GTTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC  
GGATCTGCTGGCTATGAA-3', SEQ ID NO: 164).  
Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

#### Beispiel 17: Expression von OtELO1 und OtELO2 in Hefen

Hefen, die wie unter Beispiel 15 mit den Plasmiden pYES3, pYES3-OtELO1 und pYES3-OtELO2 transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanololyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C (halten) programmiert.

Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch.*

Biochem. Biophys. 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, FEBS Letters. 439(3):215-218.

Beispiel 18: Funktionelle Charakterisierung von OtELO1 und OtELO2:

- 5 Die Substratspezifität der OtElo1 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Tab.8). Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der OtElo1-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen OtElo1 funktional exprimiert werden konnte.

- 10 Tabelle 7 zeigt, dass die OtElo1 eine enge Substratspezifität aufweist. Die OtElo1 konnte nur die C20-Fettsäuren Eicosapentaensäure (Figur 7) und Arachidonsäure (Figur 8) elongieren, bevorzugte aber die  $\omega$ -3-desaturierte Eicosapentaensäure.

Tabelle 8:

Fettsäuresubstrat	Umsatz (in %)
16:0	-
16:1 <sup>Δ9</sup>	-
18:0	-
18:1 <sup>Δ9</sup>	-
18:1 <sup>Δ11</sup>	-
18:2 <sup>Δ9,12</sup>	-
18:3 <sup>Δ8,9,12</sup>	-
18:3 <sup>Δ5,9,12</sup>	-
20:3 <sup>Δ8,11,14</sup>	-
20:4 <sup>Δ5,8,11,14</sup>	10,8 ± 0,6
20:5 <sup>Δ5,8,11,14,17</sup>	46,8 ± 3,6
22:4 <sup>Δ7,10,13,16</sup>	-
22:6 <sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>	-

Tabelle 8 zeigt die Substratspezifität der Elongase OtElo1 für C20 polyungesättigte Fettsäuren mit einer Doppelbindung in  $\Delta 5$  Position gegenüber verschiedenen Fettsäuren.

- 5 Die Hefen, die mit dem Vektor pOTE1 transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert. Jeder Wert gibt den Mittelwert ( $n=3$ )  $\pm$  Standardabweichung wieder.

- 10 Die Substratspezifität der OtElo2 (SEQ ID NO: 81) konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Tab. 9). Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der OtElo2-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen OtElo2 funktional exprimiert werden konnte.

Tabelle 9:

Fettsäuresubstrat	Umsatz (in %)
16:0	-
16:1 $\Delta^9$	-
16:3 $\Delta^{7,10,13}$	-
18:0	-
18:1 $\Delta^6$	-
18:1 $\Delta^9$	-
18:1 $\Delta^{11}$	-
18:2 $\Delta^{9,12}$	-
18:3 $\Delta^{6,9,12}$	15,3 $\pm$
18:3 $\Delta^{5,9,12}$	-
18:4 $\Delta^{6,9,12,15}$	21,1 $\pm$
20:2 $\Delta^{11,14}$	-
20:3 $\Delta^{8,11,14}$	-
20:4 $\Delta^{5,8,11,14}$	-
20:5 $\Delta^{5,8,11,14,17}$	-
22:4 $\Delta^{7,10,13,16}$	-
22:5 $\Delta^{7,10,13,16,19}$	-
22:6 $\Delta^{4,7,10,13,16,19}$	-

Tabelle 9 zeigt die Substratspezifität der Elongase OtElo2 gegenüber verschiedenen Fettsäuren.

- 5 Die Hefen, die mit dem Vektor pOTE2 transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert. Jeder Wert gibt den Mittelwert ( $n=3$ )  $\pm$  Standardabweichung wieder.

- 10 Die enzymatische Aktivität, die in Tabelle 9 wiedergegeben wird, zeigt klar, dass OTELO2 eine  $\Delta$ -6-Elongase ist.

Beispiel 19: Klonierung von Genen aus *Thalassiosira pseudonana*

- 15 Durch Suche nach konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen mit Hilfe der in der Anmeldung aufgeführten Elongase-Gene mit  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität oder  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität konnten zwei Sequenzen mit entsprechenden Motiven in einer *Thalassiosira pseudonana* Sequenzdatenbank (genomische Sequenzen) identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die folgenden Sequenzen:

Gen-Name	SEQ ID	Aminosäuren
TpELO1 ( $\Delta$ 5-Elongase)	43	358
TpELO2 ( $\Delta$ 5-Elongase)	59	358
TpELO3 ( $\Delta$ 6-Elongase)	45	272

- 20 Eine 2 L Kultur von *T. pseudonana* wurde in f/2 Medium (Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals* (Eds. Smith, W.L. and Chanley, M.H.), Plenum Press, New York, pp 29–60.) für 14 d (= Tage) bei einer Lichtstärke von 80 E/cm<sup>2</sup> angezogen. Nach Zentrifugation der Zellen wurde RNA mit Hilfe des RNAeasy Kits der Firma Quiagen (Valencia, CA, US) nach Herstellerangaben isoliert. Die mRNA wurde mit dem Marathon cDNA Amplification-Kit (BD Biosciences) reverse transkribiert und entsprechend den Herstellerangaben Adaptoren ligiert. Die cDNA-Bank wurde dann für die PCR zur Klonierung von Expressionsplasmiden mittels 5'- und 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) verwendet.

Beispiel 20: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in - Hefen

- 30 Die entsprechenden Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie die Hefe-Konsensus-Sequenz für hocheffiziente Translation (Kozak, Cell 1986, 44:283-292)

- neben dem Startcodon trugen. Die Amplifizierung der TpElo-DNAs wurde jeweils mit 1 µL cDNA, 200 µM dNTPs, 2,5 U *Advantage*-Polymerase und 100 pmol eines jeden Primers in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: Erste Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, gefolgt von 30
- 5 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, 55°C für 1 Minute und 72°C für 2 Minuten sowie ein letzter Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten.

Für die Klonierung der Sequenz zur heterologen Expression in Hefen wurden folgende Oligonukleotide für die PCR-Reaktion verwendet:

Gen-Name und SEQ ID NO:	Primersequenz
TpELO1 ( $\Delta 5$ -Elongase), SEQ ID NO: 59	F:5'-accatgtgctcaccaccgccgtc (SEQ ID NO: 158)  R:5'- ctacatggcaccagtaac (SEQ ID NO: 159)
TpELO2 ( $\Delta 5$ -Elongase), SEQ ID NO: 85	F:5'-accatgtgctcatcaccgccgtc (SEQ ID NO: 160)  R:5'-ctacatggcaccagtaac (SEQ ID NO: 161)
TpELO3 ( $\Delta 6$ -Elongase), SEQ ID NO:45	F:5'-accatggacgcctacaacgctgc (SEQ ID NO: 162)  R:5'- ctaagcactcttcttctt (SEQ ID NO: 163)

\*F=forward primer, R=reverse primer

- 10 Die PCR Produkte wurde für 30 min bei 21 °C mit dem Hefe-Expressionsvektor - pYES2.1-TOPO (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben inkubiert. Das PCR-Produkt wird dabei durch einen T-Überhang und Aktivität einer Topoisomerase (Invitrogen) in den Vektor ligiert. Nach der Inkubation erfolgte dann die Transformation von *E. coli* DH5 $\alpha$  Zellen. Entsprechende Klone wurden durch PCR identifiziert, die Plasmid-DNA
- 15 mittels Qiagen DNAeasy-Kit isoliert und durch Sequenzierung verifiziert. Die korrekte Sequenz wurde dann in den *Saccharomyces* Stamm INVSc1 (Invitrogen) durch Elektroporation (1500 V) transformiert. Zur Kontrolle wurde der leere Vektor pYES2.1 parallel transformiert. Anschließend wurden die Hefen auf Komplett-Minimalmedium ohne Uracil mit 2 % Glucose ausplattiert. Zellen, die ohne Uracil im Medium wach-
- 20 tumsfähig waren, enthalten damit die entsprechenden Plasmide pYES2.1, pYES2.1-TpELO1, pYES2.1-TpELO2 und pYES2.1-TpELO3. Nach der Selektion wurden je zwei Transformaten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

**Beispiel 21: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen**

Für die Transformation von Pflanzen wird ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu wird mit folgendem Primerpaar NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenz eingefügt:

**PSUN-TPELO1**

Forward: 5'-GCGGCCGCACCATGTGCTCACCACCGCCGTC (SEQ ID NO: 152)

Reverse: 3'-GCGGCCGCCTACATGGCACCAGTAAC (SEQ ID NO: 153)

**PSUN-TPELO2**

Forward: 5'-GCGGCCGCACCATGTGCTCATCACCACCGCCGTC (SEQ ID NO: 154)

Reverse: 3'-GCGGCCGCCTACATGGCACCAGTAAC (SEQ ID NO: 155)

**PSUN-TPELO3**

Forward: 5'-GCGGCCGCaccatggacgcctacaacgctgc (SEQ ID NO: 156)

Reverse: 3'-GCGGCCGCCTAAGCACTCTTCTTCTTT (SEQ ID NO: 157)

**15 Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):**

5,00 µL Template cDNA

5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>

5,00 µL 2mM dNTP

1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)

**20 0,50 µL Advantage-Polymerase**

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

**25 Elongationstemperatur: 2 min 72°C**

Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte werden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert.

Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wird in gleicherweise inkubiert.

Anschliessend werden die PCR Produkte sowie der 7624 bp große Vektor durch

**30 Agarose-Gelelektrophorese** aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgt mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschließend werden Vektor und PCR-Produkte ligiert.

Dazu wird das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide pSUN-TPELO1, pSUN-TPELO2 und pSUN-TPELO3 werden durch Sequenzierung

**35 verifiziert.**



pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* 25:989-994). pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des Octopinsynthase-Gens aus dem *A. tumefaciens* Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (6), 499-511 (1982) Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1-684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels künstlichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert.

(Primersequenz: 5'-  
15 GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC  
GGATCTGCTGGCTATGAA-3'; SEQ ID NO: 151).

Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

Die Lipidextraktion aus Hefen und Samen erfolgte identisch zu Beispiel 6.

Beispiel 22: Expression von TpELO1, TpELO2 und TpELO3 in Hefen

Hefen, die wie unter Beispiel 4 mit den Plasmiden pYES2, pYES2-TpELO1, pYES2-TpELO2 und pYES2-TpELO3 transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolysen hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C (halten) programmiert.

Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch.*

- 5 Biochem. Biophys. 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

Beispiel 23: Funktionelle Charakterisierung von TpELO1 und TpELO3:

- 10 Die Substratspezifität der TpElo1 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Fig. 9). Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der TpElo1-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen TpElo1 funktional exprimiert werden konnte.

- 15 Tabelle 10 zeigt, dass die TpElo1 eine enge Substratspezifität aufweist. Die TpElo1 konnte nur die C20-Fettsäuren Eicosapentaensäure und Arachidonsäure elongieren, bevorzugte aber die  $\omega$ -3-desaturierte Eicosapentaensäure.

Die Hefen, die mit dem Vektor pYES2-TpELO1 transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

- 20 Tabelle 10: Expression von TpELO1 in Hefe. In den Spalten 1 und 3 sind die Kontrollreaktionen für die Spalten 2 (gefüttert 250  $\mu$ M 20:4  $\Delta$ 5,8,11,14) und 4 (gefüttert 250  $\mu$ M 20:5  $\Delta$ 5,8,11,14,17) wiedergegeben.

	Expression	Expression	Expression	Expression
Fettsäuren	1	2	3	4
16:0	18.8	17.8	25.4	25.2
16:1 $\Delta^9$	28.0	29.8	36.6	36.6
18:0	5.2	5.0	6.8	6.9
18:1 $\Delta^9$	25.5	23.6	24.6	23.9
20:4 $\Delta$ 5,8,11,14	<b>22.5</b>	<b>23.4</b>	-	-
22:4 $\Delta$ 7,10,13,16	-	<b>0.4</b>	-	-
20:5 $\Delta$ 5,8,11,14,17	-	-	<b>6.6</b>	<b>6.5</b>
22:5 $\Delta$ 7,10,13,16,19	-	-	-	<b>0.9</b>
% Umsatz	<b>0</b>	<b>1.7</b>	<b>0</b>	<b>12.2</b>

- Die Substratspezifität der TpElo3 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Fig. 10). Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der TpElo3-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen
- 5 TpElo3 funktional exprimiert werden konnte.

Tabelle 11 zeigt, dass die TpElo3 eine enge Substratspezifität aufweist. Die TpElo3 konnte nur die C18-Fettsäuren  $\gamma$ -Linolensäure und Stearidonsäure elongieren, bevorzugte aber die  $\omega$ -3-desaturierte Stearidonsäure.

- Die Hefen, die mit dem Vektor pYES2-TpELO3 transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.
- 10

- Tabelle 11: Expression von TpELO3 in Hefe. Spalte 1 zeigt das Fettsäureprofil von Hefe ohne Fütterung. Spalte 2 zeigt die Kontrollreaktion. In den Spalten 3 bis 6 wurden  $\gamma$ -Linolensäure, Stearidonsäure, Arachidonsäure und Eicosapentaensäure gefüttert (250  $\mu$ M jeder Fettsäure).
- 15

Fettsäuren	1	2	3	4	5	6
16:0	17.9	20.6	17.8	16.7	18.8	18.8
16:1 <sup><math>\Delta^9</math></sup>	41.7	18.7	27.0	33.2	24.0	31.3
18:0	7.0	7.7	6.4	6.6	5.2	6.0
18:1 <sup><math>\Delta^9</math></sup>	33.3	16.8	24.2	31.8	25.5	26.4
18:2 <sup><math>\Delta^9,12</math></sup>	-	36.1	-	-	-	-
18:3 <sup><math>\Delta^6,9,12</math></sup>	-	-	6.1	-	-	-
18:4 <sup><math>\Delta^6,9,12,15</math></sup>	-	-	-	1.7	-	-
20:2 <sup><math>\Delta^{11,14}</math></sup>	-	0	-	-	-	-
20:3 <sup><math>\Delta^{8,11,14}</math></sup>	-	-	18.5	-	-	-
20:4 <sup><math>\Delta^{8,11,14,17}</math></sup>	-	-	-	10.0	-	-
20:4 <sup><math>\Delta^{5,8,11,14}</math></sup>	-	-	-	-	22.5	-
22:4 <sup><math>\Delta^{7,10,13,16}</math></sup>	-	-	-	-	0	-
20:5 <sup><math>\Delta^{5,8,11,14,17}</math></sup>	-	-	-	-	-	17.4
22:5 <sup><math>\Delta^{7,10,13,16,19}</math></sup>	-	-	-	-	-	0
% Umsatz	0	0	75	85	0	0

Beispiel 24: Klonierung eines Expressionsplasmides zur heterologen Expression der Pi-omega3Des in Hefen

Der Pi-omega3Des Klon wurde für die heterologe Expression in Hefen über PCR mit entsprechenden Pi-omega3Des spezifischen Primern in den Hefe-Expressionsvektor pYES3 kloniert. Dabei wurde ausschließlich der für das Pi-omega3Des Protein kodierende offene Leseraster des Gens amplifiziert und mit zwei Schnittstellen für die Klonierung in den pYES3 Expressionsvektor versehen:

Forward Primer: 5'-TAAGCTTACATGGCGACGAAGGAGG (SEQ ID NO: 149)  
Reverse Primer: 5'-TGGATCCACTTACGTGGACTTGGT (SEQ ID NO: 150)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

5,00 µL Template cDNA  
5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>  
5,00 µL 2mM dNTP  
1,25 µL je Primer (10 pmol/µL des 5'-ATG sowie des 3'-Stopp Primers)  
0,50 µL Advantage-Polymerase  
Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C  
Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C  
Elongationstemperatur: 2 min 72°C  
Anzahl der Zyklen: 35

Das PCR Produkt wurde für 2 h bei 37 °C mit den Restriktionsenzymen HindIII und BamHI inkubiert. Der Hefe-Expressionsvektor pYES3 (Invitrogen) wurde in gleicherweise inkubiert. Anschließend wurde das 1104 bp große PCR Produkt sowie der Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolge mittels Qiagen Gel purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und Desaturase-cDNA ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pYES3-Pi-omega3Des wurde durch Sequenzierung überprüft und in den Saccharomyces Stamm INVSc1 (Invitrogen) durch Elektroporation (1500 V) transformiert. Zur Kontrolle wurde pYES3 parallel transformiert. Anschliessend wurden die Hefen auf Komplet-Minimalmedium ohne Tryptophan mit 2 % Glucose ausplattiert. Zellen, die auf ohne Tryptophan im Medium wachstumsfähig waren, enthalten damit die entsprechenden Plasmide pYES3, pYES3-Pi-omega3Des. Nach der Selektion wurden je zwei Transformaten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

Beispiel 25: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

Für die Transformation von Pflanzen wurde ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu wurde mit folgendem Primerpaar NotI-

- 5 Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenz eingefügt:  
PSUN-Pi-omega3Des

Reverse: 3'-GCGGCCGCTTACGTGGACTTGGTC (SEQ ID NO: 147)

Forward: 5'-GCGGCCGCGatGGCGACGAAGGAGG (SEQ ID NO: 148)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

- 10 5,00 µL Template cDNA  
5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>  
5,00 µL 2mM dNTP  
1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)  
0,50 µL Advantage-Polymerase  
15 Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

- 20 Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte wurden für 4 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wurde in gleicherweise inkubiert. Anschließend wurde die PCR Produkte sowie der 7624 bp große Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente  
25 ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolge mittels Qiagen Gel purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschliessend wurden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pSUN-Piomega3Des wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Beispiel 26: Expression von Pi-omega3Des in Hefen

- 30 Hefen, die wie unter Beispiel 24 mit dem Plasmid pYES3 oder pYES3- Pi-omega3Des transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:  
Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethyl-

ester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C (halten) programmiert. Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

Beispiel 27: Funktionelle Charakterisierung von Pi-omega3Des:

Die Substratspezifität der Pi-omega3Des konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Figur 12 bis 18). Die gefütterten Substrate liegen in großen Mengen in allen transgenen Hefen vor, wodurch die Aufnahme dieser Fettsäuren in die Hefen bewiesen ist. Die transgenen Hefen zeigen die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der Pi-omega3Des-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen Pi-omega3Des funktional exprimiert werden konnte.

Figur 12 gibt die Desaturierung von Linolsäure (18:2 ω-6-Fettsäure) zu α-Linolensäure (18:3 ω-3-Fettsäure) durch die Pi-omega3Des wieder. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen, die mit dem Leervektor pYES2 (Figur 12 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 12 B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von C18:2<sup>Δ9,12</sup>-Fettsäure (300 µM) kultiviert. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

In Figur 13 ist die Desaturierung von γ-Linolensäure (18:3 ω-6-Fettsäure) zu Stearidonsäure (18:4 ω-3-Fettsäure) durch Pi-omega3Des wiedergegeben. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen, die mit dem Leervektor pYES2 (Figur 13 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 13 B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von γ-C18:3<sup>Δ6,9,12</sup>-Fettsäure (300 µM) kultiviert. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

Figur 14 gibt die Desaturierung von C20:2- $\omega$ -6-Fettsäure zu C20:3- $\omega$ -3-Fettsäure durch Pi-omega3Des wieder. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen, die mit dem Leervektor pYES2 (Figur 14 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 14 B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von C20:2 <sup>$\Delta^{11,14}$</sup> -Fettsäure (300  $\mu$ M) kultiviert. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

Figur 15 gibt die Desaturierung von C20:3- $\omega$ -6-Fettsäure zu C20:4- $\omega$ -3-Fettsäure durch Pi-omega3Des wieder. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen, die mit dem Leervektor pYES2 (Figur 15 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 15 B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von C20:3 <sup>$\Delta^{8,11,14}$</sup> -Fettsäure (300  $\mu$ M) kultiviert. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

In Figur 16 wird die Desaturierung von Arachidonsäure (C20:4- $\omega$ -6-Fettsäure) zu Eicosapentaensäure (C20:5- $\omega$ -3-Fettsäure) durch die Pi-omega3Des gezeigt.

Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen, die mit dem Leervektor pYES2 (Figur 16 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 16 B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von C20:4 <sup>$\Delta^{5,8,11,14}$</sup> -Fettsäure (300  $\mu$ M) kultiviert. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

Figur 17 gibt die Desaturierung von Docosatetraensäure (C22:4- $\omega$ -6-Fettsäure) zu Docosapentaensäure (C22:5- $\omega$ -3-Fettsäure) durch Pi-omega3Des wieder. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen, die mit dem Leervektor pYES2 (Figur 17 A) oder dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des (Figur 17 B) transformiert worden waren. Die Hefen wurden in Minimalmedium in Gegenwart von C22:4 <sup>$\Delta^{7,10,13,16}$</sup> -Fettsäure (300  $\mu$ M) kultiviert. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

Die Substratspezifität der Pi-omega3Des gegenüber verschiedenen Fettsäuren ist Figur 18 zu entnehmen. Die Hefen, die mit dem Vektor pYes3-Pi-omega3Des transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert. Jeder Wert gibt einen Mittelwert aus drei Messungen wieder. Die Umsetzungsraten (% Desaturation) wurden mit der Formel:  
[Produkt]/([Produkt]+[Substrat])\*100 errechnet.

Wie unter Beispiel 9 beschrieben kann auch die Pi-omega3Des zur Erzeugung transgener Pflanzen verwendet werden. Aus den Samen dieser Pflanzen kann dann die Lipidextraktion wie unter Beispiel 6 beschrieben erfolgen.

Beispiel 28: Klonierung von Desaturasegenen aus *Ostreococcus tauri*

- 5 Durch Suche nach konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen mit Hilfe von konservierten Motiven (His-Boxen, Domergue et al. 2002, Eur. J. Biochem. 269, 4105-4113) konnten fünf Sequenzen mit entsprechenden Motiven in einer *Ostreococcus tauri* Sequenzdatenbank (genomische Sequenzen) identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die folgenden Sequenzen:

Gen-Name	SEQ ID	Aminosäuren	Homologie
OtD4	SEQ ID NO: 95	536	$\Delta$ -4-Desaturase
OtD5.1	SEQ ID NO: 91	201	$\Delta$ -5-Desaturase
OtD5.2	SEQ ID NO: 93	237	$\Delta$ -5-Desaturase
OtD6.1	SEQ ID NO: 89	456	$\Delta$ -6-Desaturase
OtFad2	SEQ ID NO: 107	361	$\Delta$ -12-Desaturase

10

Die Alignments zur Auffindung von Homologien der einzelnen Gene wurden mit dem tBLASTn-Aalgorithmus (Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990, 215: 403 – 410) durchgeführt.

Die Klonierung erfolgte wie folgt:

- 15 40 ml einer *Ostreococcus tauri* Kultur in der stationären Phase wurden abzentrifugiert und in 100  $\mu$ l Aqua bidest resuspendiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Auf der Basis des PCR-Verfahren wurden die zugehörigen genomischen DNAs amplifiziert. Die entsprechenden Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie die Hefe-Konsensus-Sequenz für hocheffiziente Translation (Kozak, Cell 1986, 44:283-292) neben dem Startcodon
- 20 trugen. Die Amplifizierung der OtDes-DNAs wurde jeweils mit 1  $\mu$ l aufgetauten Zellen, 200  $\mu\text{M}$  dNTPs, 2,5 U *Taq*-Polymerase und 100 pmol eines jeden Primers in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: Erste Denaturierung bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei  $94^{\circ}\text{C}$  für 30
- 25 Sekunden,  $55^{\circ}\text{C}$  für 1 Minute und  $72^{\circ}\text{C}$  für 2 Minuten sowie ein letzter Verlängerungsschritt bei  $72^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten.

Folgende Primer wurden für die PCR eingesetzt:

OtDes6.1 Forward: 5'ggtagcacataatgtgcgtggagacggaaaataacg3' (SEQ ID NO: 145)

OtDes6.1 Reverse: 5'ctcgagttacgccgtcttccggagtgttgcc3' (SEQ ID NO: 146)



Beispiel: 29 Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in Hefen:

5 Zur Charakterisierung der Funktion der Desaturase OtDes6.1 (=  $\Delta$ -6-Desaturase) aus *Ostreococcus tauri* wurde der offene Leserahmen der DNA stromabwärts des Galactose-induzierbaren GAL1-Promotors von pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) kloniert, wobei der entsprechenden pYES2.1-OtDes6.1 Klon erhalten wurde. In entsprechender Art und Weise können weitere Desaturase-Gene aus *Ostreococcus* kloniert werden.

10 Der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm 334 wurde durch Elektroporation (1500 V) mit dem Vektor pYES2.1-OtDes6.1 transformiert. Als Kontrolle wurde eine Hefe verwendet, die mit dem leeren Vektor pYES2 transformiert wurde. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgte auf Komplet-Minimalmedium (CMdum)-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Uracil. Nach der Selektion wurden je drei Transformanten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

15 Für die Expression der OtDes6.1 Desaturase wurden zunächst Vorkulturen aus jeweils 5 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2% (w/v) Raffinose aber ohne Uracil mit den ausgewählten Transformanten angeimpft und 2 Tage bei 30°C, 200 rpm inkubiert. 5 ml CMdum-Flüssigmedium (ohne Uracil) mit 2% Raffinose und 300  $\mu$ M verschiedener Fettsäuren wurden dann mit den Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft.  
20 Die Expression wurde durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen wurden für weitere 96 h bei 20°C inkubiert.

Beispiel: 30 Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

25 Für die Transformation von Pflanzen wird ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu werden mittels PCR NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenzen eingefügt. Die entsprechenden Primersequenzen werden von den 5'- und 3-Bereich der Desaturasen abgeleitet.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50  $\mu$ L):

5,00  $\mu$ L Template cDNA  
30 5,00  $\mu$ L 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>  
5,00  $\mu$ L 2mM dNTP  
1,25  $\mu$ L je Primer (10 pmol/ $\mu$ L)  
0,50  $\mu$ L Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

## Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

5 Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte werden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wird in gleicherweise inkubiert. Anschliessend werden die PCR Produkte sowie der Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgt mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschliessend werden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide werden durch Sequenzierung verifiziert.

15 pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Mol Biol. 25:989-994). pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI-Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des Ostreococcus-Gens aus dem A. tumefaciens Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid-encoded octopine synthase gene J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 499-511 (1982). Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1 bis 684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert. (Primersequenz: 5'-  
GTCTGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC  
GGATCTGCTGGCTATGAA-3', SEQ ID NO: 144).

30 Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/SalI nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von Arabidopsis thaliana, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

Beispiel: 31 Expression von OtDes6.1 in Hefen

35 Hefen, die wie unter Beispiel 4 mit den Plasmiden pYES2 und pYES2-OtDes6.2 transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethyl-

ester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert.

Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

Beispiel: 32      Funktionelle Charakterisierung von Desaturasen aus *Ostreococcus*:

Die Substratspezifität von Desaturasen kann nach Expression in Hefe (siehe Beispiele Klonierung von Desaturase-Genen, Hefeexpression) durch die Fütterung mittels verschiedener Hefen ermittelt werden. Beschreibungen für die Bestimmung der einzelnen Aktivitäten finden sich in WO 93/11245 für Δ15-Desaturasen, WO 94/11516 für Δ12-Desaturasen, WO 93/06712, US 5,614,393, US5614393, WO 96/21022, WO0021557 und WO 99/27111 für Δ6-Desaturasen, Qiu et al., 2001, *J. Biol. Chem.* 276, 31561-31566 für Δ4-Desaturasen, Hong et al. 2002, *Lipids* 37,863-868 für Δ5-Desaturasen.

Tabelle 12 gibt die Substratspezifität der Desaturase OtDes6.1 gegenüber verschiedenen Fettsäuren wieder. Die Substratspezifität der OtDes6.1 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden. Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der OtDes6.2-Reaktion (Fig. 20). Dies bedeutet, dass das Gen OtDes6.1 funktional exprimiert werden konnte.

Die Hefen, die mit dem Vektor pYES2-OtDes6.1 transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert. Jeder Wert gibt den Mittelwert (n=3) ± Standardabweichung wieder. Die Aktivität entspricht der Konversionsrate errechnet nach  $[\text{Substrat}/(\text{Substrat}+\text{Produkt})\cdot 100]$ .

- Tabelle 12 zeigt, dass die OtDes6.1 eine Substratspezifität für Linol- und Linolensäure (18:2 und 18:3) aufweist, da mit diesen Fettsäuren die höchsten Aktivitäten erreicht werden. Die Aktivität für Ölsäure (18:1) und Palmitoleinsäure (16:1) ist dagegen deutlich geringer. Die bevorzugte Umsetzung von Linol- und Linolensäure zeigt die
- 5 Eignung dieser Desaturase für die Herstellung von polyungesättigten Fettsäuren.

Substrate	Aktivität in %
16:1 <sup>Δ<sup>9</sup></sup>	5,6
18:1 <sup>Δ<sup>9</sup></sup>	13,1
18:2 <sup>Δ<sup>9,12</sup></sup>	68,7
18:3 <sup>Δ<sup>9,12,15</sup></sup>	64,6

- Figur 20 zeigt die Umsetzung von Linolsäure durch OtDes6.1. Die Analyse der FAMES erfolgte über Gaschrommatographie. Das gefütterte Substrat (C18:2) wird zu  $\gamma$ -C18:3 umgesetzt. Sowohl Edukt als auch das entstandene Produkt sind durch Pfeile
- 10 markiert.

- In Figur 21 wird die Umsetzung von Linolsäure (= LA) und  $\alpha$ -Linolensäure (= ALA) in Gegenwart von OtDes6.1 zu  $\gamma$ -Linolensäure (= GLA) bzw. Stearidonsäure (= STA) wiedergegeben (Figur 21 A und C). Weiterhin zeigt Figur 21 die Umsetzung von Linolsäure (= LA) und  $\alpha$ -Linolensäure (= ALA) in Gegenwart der  $\Delta$ -6-Desaturase
- 15 OtDes6.1 zusammen mit der  $\Delta$ -6-Elongase PSE1 aus *Physcomitrella patens* (Zank et al. 2002, Plant J. 31:255-268) und der  $\Delta$ -5-Desaturase PtD5 aus *Phaeodactylum tricornutum* (Domergue et al. 2002, Eur. J. Biochem. 269, 4105-4113) zu Dihomo- $\gamma$ -linolensäure (= DHGLA) und Arachidonsäure (= ARA, Figur 21 B) bzw. zu Dihomostearidonsäure (= DHSTA) bzw. Eicosapentaensäure (= EPA, Figur 21 D). Figur 21 zeigt
- 20 deutlich, dass die Reaktionsprodukte GLA und STA der  $\Delta$ -6-Desaturase OtDes6.1 in Gegenwart der  $\Delta$ -6-Elongase PSE1 fast quantitativ zu DHGLA bzw. DHSTA elongiert wird. Die nachfolgende Desaturierung durch die  $\Delta$ -5-Desaturase PtD5 erfolgt ebenfalls reibungslos zu ARA bzw. EPA. Es werden ca. 25 – 30% des Elongaseprodukts desaturiert (Figur 21 B und D).

Die folgenden Tabelle 13 gibt eine Übersicht über die klonierten *Ostreococcus* Desaturasen wieder:

<u><b>Ostreococcus tauri Desaturasen</b></u>							
<b>Name</b>	<b>bp</b>	<b>aa</b>	<b>Homologie</b>	<b>Cyt. B5</b>	<b>His-Box1</b>	<b>His-Box2</b>	<b>His-Box3</b>
OtD4	1611	536	$\Delta$ -4- Desaturase	HPGG	HCANH	WRYHHQVSHH	QVEHHLFP
OtD5.1	606	201	$\Delta$ -5- Desaturase	-	-	-	QVVHHLFP
OtD5.2	714	237	$\Delta$ -5- Desaturase	-	-	WRYHHMVSHH	QIEHHLPF
OtD6.1	1443	480	$\Delta$ -6- Desaturase	HPGG	HEGGH	WNSMHNKHH	QVIHHLFP
OtFAD2	1086	361	$\Delta$ -12- Desaturase	-	HECGH	WQRSHAVHH	HVAHH

Beispiel : 33 Klonierung von Desaturasegenen aus *Thalassiosira pseudonana*

- 5 Durch Suche nach konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen mit Hilfe von konservierten Motiven (His-Boxen, siehe Motive) konnten sechs Sequenzen mit entsprechenden Motiven in einer *Thalassiosira pseudonana* Sequenzdatenbank (genomische Sequenzen) identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die folgenden Sequenzen:

<b>Gen-Name</b>	<b>SEQ ID</b>	<b>Aminosäuren</b>	<b>Homologie</b>
TpD4	SEQ ID NO: 103	503	$\Delta$ -4-Desaturase
TpD5-1	SEQ ID NO: 99	476	$\Delta$ -5-Desaturase
TpD5-2	SEQ ID NO: 101	482	$\Delta$ -5-Desaturase
TpD6	SEQ ID NO: 97	484	$\Delta$ -6-Desaturase
TpFAD2	SEQ ID NO: 109	434	$\Delta$ -12-Desaturase
TpO3	SEQ ID NO: 105	418	$\omega$ -3-Desaturase

10

Die Klonierung erfolgte wie folgt:

40 ml einer *Thalassiosira pseudonana* Kultur in der stationären Phase wurden abzentrifugiert und in 100  $\mu$ l Aqua bidest resuspendiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Auf der Basis des PCR-Verfahren wurden die zugehörigen genomischen DNAs amplifiziert. Die

- entsprechenden Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie die Hefe-Konsensus-Sequenz für hocheffiziente Translation (Kozak, Cell 1986, 44:283-292) neben dem Startcodon trugen. Die Amplifizierung der TpDes-DNAs wurde jeweils mit 1 µl aufgetauten Zellen, 200 µM dNTPs, 2,5 U *Taq*-Polymerase und 100 pmol eines jeden
- 5 Primers in einem Gesamtvolumen von 50 µl durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: Erste Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, 55°C für 1 Minute und 72°C für 2 Minuten sowie ein letzter Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten.

- Beispiel: 34 Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in
- 10 Hefen:

Zur Charakterisierung der Funktion der Desaturasen aus *Thalassiosira pseudonana* wird der offenen Leserahmen der jeweiligen DNA stromabwärts des Galactose-induzierbaren GAL1-Promotors von pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) kloniert, wobei der entsprechenden pYES2.1-Klone erhalten werden.

- 15 Der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm 334 wird durch Elektroporation (1500 V) mit den Vektoren pYES2.1-TpDesaturasen transformiert. Als Kontrolle wird eine Hefe verwendet, die mit dem leeren Vektor pYES2 transformiert wird. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgt auf Komplett-Minimalmedium (CMdum)-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Uracil. Nach der Selektion werden je drei Transformanten zur
- 20 weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

- Für die Expression der Tp-Desaturasen werden zunächst Vorkulturen aus jeweils 5 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2% (w/v) Raffinose aber ohne Uracil mit den ausgewählten Transformanten angeimpft und 2 Tage bei 30°C, 200 rpm inkubiert.
- 25 5 ml CMdum-Flüssigmedium (ohne Uracil) mit 2% Raffinose und 300 µM verschiedener Fettsäuren werden dann mit den Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Die Expression wird durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen werden für weitere 96 h bei 20°C inkubiert.

Beispiel: 35 Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

- 30 Für die Transformation von Pflanzen wird ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu werden mittels PCR NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenzen eingefügt. Die entsprechenden Primersequenzen werden von den 5'- und 3-Bereich der Desaturasen abgeleitet.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

- 5,00 µL Template cDNA
- 5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 5,00 µL 2mM dNTP
- 5 1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)
- 0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

- Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C
- 10 Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C
- Elongationstemperatur: 2 min 72°C
- Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte werden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wird in gleicherweise inkubiert.

- 15 Anschliessend werden die PCR Produkte sowie der Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgt mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschliessend werden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide
- 20 werden durch Sequenzierung verifiziert.

- pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Mol Biol 25:989-994). pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des OCS-Gens aus dem A. tumefaciens Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid-encoded octopine synthase gene J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 499-511 (1982). Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden
- 25 1 bis 684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert. (Primersequenz: 5'-
  - 30 GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC
  - 35 GGATCTGCTGGCTATGAA-3'; SEQ ID NO: 143)

Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeich-

nung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

Beispiel: 36 Expression von Tp-Desaturasen in Hefen

- 5 Hefen, die wie unter Beispiel 4 mit den Plasmiden pYES2 und pYES2-TpDesaturasen transformiert werden, werden folgendermaßen analysiert:

Die Hefezellen aus den Hauptkulturen werden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten werden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu werden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren werden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend werden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben werden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse sind wie folgt: Die Ofentemperatur wird von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert.

- 20 Die Identifikation der Signale erfolgt durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 25 439(3):215-218.

Beispiel: 37 Funktionelle Charakterisierung von Desaturasen aus *Thalassiosira pseudonana*:

- Die Substratspezifität von Desaturasen kann nach Expression in Hefe (siehe Beispiele Klonierung von Desaturase-Genen, Hefeexpression) durch die Fütterung mittels verschiedener Hefen ermittelt werden. Beschreibungen für die Bestimmung der einzelnen Aktivitäten finden sich in WO 93/11245 für Δ15-Desaturasen, WO 94/11516 für Δ12-Desaturasen, WO 93/06712, US 5,614,393, US5614393, WO 96/21022, WO0021557 und WO 99/27111 für Δ6-Desaturasen, Qiu et al. 2001, *J. Biol. Chem.* 276, 31561-31566 für Δ4-Desaturasen, Hong et al. 2002, *Lipids* 37,863-868 für Δ5-Desaturasen.

Die Aktivität der einzelnen Desaturasen wird aus der Konversionsrate errechnet nach der Formel [Substrat/(Substrat+Produkt)\*100].



## 123

Die folgenden Tabellen 11 und 12 geben eine Übersicht über die clonierten Thalassiosira pseudonana Desaturasen wieder.

Tabelle 14: Länge und charakteristische Merkmale der clonierten Thalassiosira Desaturasen.

Desaturase	cDNA (bp)	Protein (aa)	Cyt. B5	His-Box1	His-Box2	His-Box3
TpD4	1512	503	HPGG	HDGNH	WELQHMLGHH	QIEHHLFP
TpD5-1	1431	476	HPGG	HDANH	WMAQHWTHH	QVEHHLFP
TpD5-2	1443	482	HPGG	HDANH	WLAQHWTHH	QVEHHLFP
TpD6	1449	484	HPGG	HDFLH	WKNKHNGHH	QVDHHLFP
TpFAD2 (d12)	1305	434	-	HECGH	HAKHH	HVAHHLFH
TpO3	1257	419	-	HDAGH	WLFMVTYLQH H	HVVHHLF

5

Tabelle 15: Länge, Exons, Homologie und Identitäten der clonierten Desaturasen.

Des.	GDNA (bp)	Exon 1	Exon 2	First Blast Hit	Hom./Iden.
TpD4	2633	496-1314	1571-2260	Thrautochitrium D4- des	56% / 43%
TpD5-1	2630	490-800	900-2019	Phaeodactylum D5- des	74% / 62%
TpD5-2	2643	532-765	854-2068	Phaeodactylum D5- des	72% / 61%
TpD6	2371	379-480	630-1982	Phaeodactylum D6- des	83% / 69%
TpFAD2	2667	728-2032	-	Phaeodactylum FAD2	76% / 61%
TpO3	2402	403-988	1073-1743	Chaenorhabdids Fad2	49% / 28%

Analog zu den vorgenannten Beispielen lassen sich auch die  $\Delta$ -12-Desaturasegene aus *Ostreococcus* und *Thalassiosira* clonieren.

10

Beispiel 38 Klonierung von Elongase Genen aus *Xenopus laevis* und *Ciona intestinalis*

- Durch Suche nach konservierten Bereichen (siehe Konsensus-Sequenzen, SEQ ID NO: 115 und SEQ ID NO: 116) in den Proteinsequenzen in Gendatenbanken (Genbank) mit Hilfe der in der Anmeldung aufgeführten Elongase-Gene mit  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität oder  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität konnten weitere Elongasesequenzen aus anderen Organismen identifiziert und isoliert werden. Aus *X. laevis* bzw. aus *C. intestinalis* konnten mit entsprechenden Motiven jeweils weitere Sequenzen identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die folgenden Sequenzen:

Gen-Name	Organismus	Genbank-Nr.	SEQ ID NO:	Aminosäuren
ELO(XI)	<i>Xenopus laevis</i>	BC044967	117	303
ELO(Ci)	<i>Ciona intestinalis</i>	AK112719	119	290

10

Der cDNA Klon von *X. laevis* wurde vom NIH (National Institut of Health) bezogen [Genetic and genomic tools for *Xenopus* research: The NIH *Xenopus* initiative, Dev. Dyn. 225 (4), 384-391 (2002)].

- Der cDNA Klon von *C. inetstinalis* wurde von der Universität von Kyto bezogen [Satou, Y., Yamada, L., Mochizuki, Y., Takatori, N., Kawashima, T., Sasaki, A., Hamaguchi, M., Awazu, S., Yagi, K., Sasakura, Y., Nakayama, A., Ishikawa, H., Inaba, K. and Satoh, N. "A cDNA resource from the basal chordate *Ciona intestinalis*" JOURNAL Genesis 33 (4), 153-154 (2002)].

Beispiel 39: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in - Hefen

20

- Die Amplifizierung der Elongase-DNAs wurde jeweils mit 1  $\mu$ L cDNA, 200  $\mu$ M dNTPs, 2,5 U *Advantage*-Polymerase und 100 pmol eines jeden Primers in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: Erste Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, 55°C für 1 Minute und 72°C für 2 Minuten sowie ein letzter Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten.

25

Für die Klonierung der Sequenz zur heterologen Expression in Hefen wurden folgende Oligonukleotide für die PCR-Reaktion verwendet:

Gen-Name und SEQ ID NO:	Primersequenz
ELO(XI) SEQ ID NO: 121	F:5'- AGGATCC <u>ATGG</u> CCTTCAAGGAGCTCACATC
SEQ ID NO: 122	R:5'- CCTCGAGT <u>CAAT</u> GGTTTTTGCTTTTCAATG-CACCG
ELO(Ci), SEQ ID NO: 123	F:5'- TAAGCTT <u>ATGG</u> ACGTACTTCATCGT
SEQ ID NO: 124	R:5'- TCAGATCTT <u>TAAT</u> CGGTTTTACCATT

\*F=forward primer, R=reverse primer

- Die PCR Produkte wurde für 30 min bei 21 °C mit dem Hefe-Expressionsvektor - pYES2.1-TOPO (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben inkubiert. Das PCR-Produkt wird dabei durch einen T-Überhang und Aktivität einer Topoisomerase (Invitrogen) nach Herstellerangaben in den Vektor ligiert. Nach der Inkubation erfolgte dann die Transformation von E. coli DH5α Zellen. Entsprechende Klone wurden durch PCR - identifiziert, die Plasmid-DNA mittels Qiagen DNAeasy-Kit isoliert und durch Sequenzierung verifiziert. Die korrekte Sequenz wurde dann in den Saccharomyces Stamm INVSc1 (Invitrogen) durch Elektroporation (1500 V) transformiert. Zur Kontrolle wurde der leere Vektor pYES2.1 parallel transformiert. Anschließend wurden die Hefen auf Komplett-Minimalmedium ohne Uracil mit 2 % Glucose ausplattiert. Zellen, die ohne Uracil im Medium wachstumsfähig waren, enthalten damit die entsprechenden Plasmide pYES2.1, pYES2.1-ELO(XI) und pYES2.1-ELO(Ci). Nach der Selektion wurden je zwei Transformaten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.
- 15 Beispiel 40: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

Für die Transformation von Pflanzen wird ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu werden mit folgendem Primerpaar NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenz eingefügt:.

## 20 pSUN-ELO(XI)

Forward: 5'-GCGGCCGCACCATATGGCCTTCAAGGAGCTCACATC (SEQ ID NO: 125)

Reverse: 3'-GCGGCCGCCTTCAATGGTTTTTGCTTTTCAATGCACCG (SEQ ID NO: 126)

## 25 pSUN-ELO(Ci)

Forward: 5'-GCGGCCGCACCATATGGACGTACTTCATCGT (SEQ ID NO: 127)

Reverse: 3'-GCGGCCGCCTTTAATCGGTTTTACCATT (SEQ ID NO: 128)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

- 5,00 µL Template cDNA
- 5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 5,00 µL 2mM dNTP
- 5 1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)
- 0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

- Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C
- 10 Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C
- Elongationstemperatur: 2 min 72°C
- Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte wurden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wurde in gleicherweise inkubiert.

- 15 Anschliessend wurden die PCR Produkte sowie der 7624 bp große Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide-
- 20 pSUN-ELO(XI) und pSUN-ELO(Ci) wurden durch Sequenzierung verifiziert.

- pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP [Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Mol Biol 25:989-994]. pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des Octopinsynthase-Gens aus dem A. tumefaciens Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid-encoded octopine synthase gene J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 499-511 (1982) Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1-684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert.
- 25
  - 30

Primersequenz: 5'–

- 35 GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC  
GGATCTGCTGGCTATGAA–3' (SEQ ID NO: 129).

Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeich-

nung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

Die Lipidextraktion aus Hefen und Samen erfolgte identisch zu Beispiel 6.

Beispiel 41: Expression von ELO(XI) und ELO(Ci) in Hefen

- 5 Hefen, die wie unter Beispiel 4 mit den Plasmiden pYES2, pYES2-ELO(XI) und pYES2-ELO(Ci) transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

- Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethyl-  
10 ester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organi-  
schen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest.  
15 gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit  
20 einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert.

- Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8): 761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

Beispiel 42: Funktionelle Charakterisierung von ELO(XI) und ELO(Ci):

- Die Substratspezifität der ELO(XI) konnte nach Expression und Fütterung verschiede-  
ner Fettsäuren ermittelt werden (Fig. 22). Die gefütterten Substrate sind in großen  
30 Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der ELO(XI)-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen ELO(XI) funktional exprimiert werden konnte.

- Tabelle 16 zeigt, dass die ELO(XI) eine breite Substratspezifität aufweist. Es werden sowohl C18 als auch C20 Fettsäuren verlängert, wobei eine Bevorzugung von Δ5- und  
35 Δ6-desaturierten Fettsäuren zu beobachten ist.

Die Hefen, die mit dem Vektor pYES2-ELO(XI) transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der

Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

Tabelle 16: Expression von ELO(XI) in Hefe. Beschrieben ist die Umsetzungsrate (Konversionsrate) verschiedener Edukte (gefüttert jeweils 250 µM).

Edukte	Konversion der Edukte durch ELO(XI) in %
16:0	3
16:1 <sup>Δ9</sup>	0
18:0	2
18:1 <sup>Δ9</sup>	0
18:2 <sup>Δ9,12</sup>	3
18:3 <sup>Δ6,9,12</sup>	12
18:3 <sup>Δ5,9,12</sup>	13
18:3 <sup>Δ9,12,15</sup>	3
18:4 <sup>Δ6,9,12,15</sup>	20
20:3 <sup>Δ8,11,14</sup>	5
20:3 <sup>Δ11,14,17</sup>	13
20:4 <sup>Δ5,8,11,14</sup>	15
20:5 <sup>Δ5,8,11,14,17</sup>	10
22:4 <sup>Δ7,10,13,16</sup>	0
22:6 <sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>	0

5

Die Substratspezifität der ELO(Ci) konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Fig. 23). Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die

Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der ELO(Ci)-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen ELO(Ci) funktional exprimiert werden konnte.

Tabelle 17: Expression von ELO(Ci) in Hefe. Beschrieben ist die Umsetzungsrate (Konversionsrate) verschiedener Edukte (gefüttert jeweils 250 µM).

Edukte	Konversion der Edukte durch ELO(Ci) in %
16:0	0
16:1 <sup>Δ9</sup>	0
18:0	0
18:1 <sup>Δ9</sup>	0
18:2 <sup>Δ9,12</sup>	23
18:3 <sup>Δ6,9,12</sup>	10
18:3 <sup>Δ5,9,12</sup>	38
18:3 <sup>Δ9,12,15</sup>	25
18:4 <sup>Δ6,9,12,15</sup>	3
20:3 <sup>Δ8,11,14</sup>	10
20:3 <sup>Δ11,14,17</sup>	8
20:4 <sup>Δ5,8,11,14</sup>	10
20:5 <sup>Δ5,8,11,14,17</sup>	15
22:4 <sup>Δ7,10,13,16</sup>	0
22:6 <sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>	0

5

Tabelle 17 zeigt, dass die ELO(Ci) eine breite Substratspezifität aufweist. Es werden sowohl C18 als auch C20 Fettsäuren verlängert, wobei eine Bevorzugung von Δ5- und Δ6-desaturierten Fettsäuren zu beobachten ist.

Die Hefen, die mit dem Vektor pYES2-ELO(Ci) transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

5 Beispiel 43: Klonierung von Genen aus *Ostreococcus tauri*

Durch Suche nach konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen mit Hilfe der hierin beschriebenen Elongase-Gene mit  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität oder  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität konnten je zwei Sequenzen mit entsprechenden Motiven in einer *Ostreococcus tauri* Sequenzdatenbank (genomische Sequenzen) identifiziert werden.

10 Es handelt sich dabei um die folgenden Sequenzen:

Gen-Name	SEQ ID	Aminosäuren
OtELO1, ( $\Delta$ -5-Elongase)	SEQ ID NO: 67	300
OtELO1.2, ( $\Delta$ -5-Elongase)	SEQ ID NO: 113	300
OtELO2, ( $\Delta$ -6-Elongase)	SEQ ID NO: 69	292
OtELO2.1, ( $\Delta$ -6-Elongase)	SEQ ID NO: 111	292

OtElo1 und OtElo1.2 weisen die höchste Ähnlichkeit zu einer Elongase aus *Danio rerio* auf (GenBank AAN77156; ca. 26 % Identität), während OtElo2 und OtElo2.1 die größte Ähnlichkeit zur *Physcomitrella Elo* (PSE) [ca. 36 % Identität] aufweisen (Alignments wurden mit dem tBLASTn-Algorithmus (Altschul et al., J. Mol. Biol. 1990, 215: 403 – 410) durchgeführt.

Die Klonierung der Elongasen wurde wie folgt durchgeführt:

40 ml einer *Ostreococcus tauri* Kultur in der stationären Phase wurden abzentrifugiert und in 100  $\mu$ l Aqua bidest resuspendiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Auf der Basis des PCR-Verfahren wurden die zugehörigen genomischen DNAs amplifiziert. Die entsprechenden Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie die Hefe-Konsensus-Sequenz für hocheffiziente Translation (Kozak, Cell 1986, 44:283-292) neben dem Startcodon trugen. Die Amplifizierung der OtElo-DNAs wurde jeweils mit 1  $\mu$ l aufgetauten Zellen, 200  $\mu$ M dNTPs, 2,5 U *Taq*-Polymerase und 100 pmol eines jeden Primers in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt:

25 Erste Denaturierung bei  $95^{\circ}\text{C}$  für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei  $94^{\circ}\text{C}$  für 30 Sekunden,  $55^{\circ}\text{C}$  für 1 Minute und  $72^{\circ}\text{C}$  für 2 Minuten sowie ein letzter Verlängerungsschritt bei  $72^{\circ}\text{C}$  für 10 Minuten.



Beispiel 44: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in Hefen:

- 5 Zur Charakterisierung der Funktion der Elongasen aus *Ostreococcus tauri* wurden die offenen Leserahmen der jeweiligen DNAs stromabwärts des Galactose-induzierbaren GAL1-Promotors von pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) kloniert, wobei pOTE1, pOTE1.2, pOTE2 und pOTE2.1 erhalten wurden.

- 10 Der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm 334 wurde durch Elektroporation (1500 V) mit dem Vektor pOTE1, pOTE1.2, pOTE2 bzw. pOTE2.1 transformiert. Als Kontrolle wurde eine Hefe verwendet, die mit dem leeren Vektor pYES2 transformiert wurde. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgte auf Komplett-Minimalmedium (CMdum)-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Uracil. Nach der Selektion wurden je drei Transformanten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

- 15 Für die Expression der Ot-Elongasen wurden zunächst Vorkulturen aus jeweils 5 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2% (w/v) Raffinose aber ohne Uracil mit den ausgewählten Transformanten angeimpft und 2 Tage bei 30°C, 200 rpm inkubiert. 5 ml CMdum-Flüssigmedium (ohne Uracil) mit 2% Raffinose und 300 µM verschiedener Fettsäuren wurden dann mit den Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Die Expression wurde durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen wurden für weitere 96 h bei 20°C inkubiert.

- 20 Beispiel 45: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

- 25 Für die Transformation von Pflanzen wurde ein weiterer Transformationsvektor auf Basis von pSUN-USP erzeugt. Dazu wurden mittels PCR NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenzen eingefügt. Die entsprechenden Primersequenzen wurden von den 5'- und 3-Bereich von OtElo1, OtElo1.2, OtElo2 und OtElo2.1 abgeleitet.

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

- 30 5,00 µL Template cDNA  
5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>  
5,00 µL 2mM dNTP  
1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)  
0,50 µL Advantage-Polymerase

- Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.  
Reaktionsbedingungen der PCR:  
35 Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C  
Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C  
Elongationstemperatur: 2 min 72°C  
Anzahl der Zyklen: 35

- Die PCR Produkte werden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wird in gleicherweise inkubiert. Anschließend wurden die PCR Produkte sowie der Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschliessend wurden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Die entstandenen Plasmide pSUN-OtELO1, pSUN-OtELO1.2, pSUN-OtELO2 und pSUN-OtELO2.2 wurden durch Sequenzierung verifiziert.
- 10 pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP [Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation. *Plant Mol Biol* 25:989-994]. pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des *Ostreococcus*-Gens aus dem *A. tumefaciens* Ti-Plasmid
- 15 (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene *J. Mol. Appl. Genet.* 1 (6), 499-511 (1982). Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1 bis 684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region
- 20 des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert.

Primersequenz:

- 25 5'-GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC  
GGATCTGCTGGCTATGAA-3'). (SEQ ID NO: 130)

Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeichnung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

- 30 Beispiel 46: Expression von OtElo1, OtElo1.2, OtElo2 und OtELO2.2 in Hefen

Hefen, die wie unter Beispiel 15 mit den Plasmiden pYES3, pYES3-OtELO1, pYES3-OtELO1.2, pYES3-OtELO2 und pYES3-OtELO2.2 transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

- 35 Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit

- Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organischen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-
- 5 Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C (halten) programmiert.

- Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum
- 10 Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

- 15 Beispiel 47: Funktionelle Charakterisierung von OtElo1, OtElo1.2, OtElo2 und OtElo2.1:

- Die Substratspezifität der OtElo1 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Tab. 18). Die gefütterten Substrate sind in großen
- 20 Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der OtElo1-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen OtElo1 funktional exprimiert werden konnte.

- Tabelle 18 zeigt, dass OtElo1 bzw. OtElo1.2 eine enge Substratspezifität aufweist. OtElo1 bzw. OtElo1.2 konnte nur die C20-Fettsäuren Eicosapentaensäure (Figur 24A, 24B) und Arachidonsäure (Figur 25A, 25B) elongieren, bevorzugte aber die ω-3-
- 25 desaturierte Eicosapentaensäure.

Tabelle 18 zeigt die Substratspezifität der Elongase OtElo1 und OtElo1.2 für C20 polyungesättigte Fettsäuren mit einer Doppelbindung in Δ5 Position gegenüber verschiedenen Fettsäuren.

- Die Hefen, die mit dem Vektor pOTE1 bzw. pOTE1.2 transformiert worden waren,
- 30 wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

- Die Substratspezifität der OtElo2 (SEQ ID NO: 81) OtElo2.1 (SEQ ID NO: 111) konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Tab. 19).
- 35 Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der OtElo2-Reaktion. Dies bedeutet, dass die Gene OtElo2 und OtElo2.1 funktional exprimiert werden konnte.

Tabelle 18:

Fettsäuresubstrat	Umsatz (in %) OtElo1	Umsatz (in %) OtElo1.2
16:0	-	-
16:1 <sup>Δ9</sup>	-	-
18:0	-	-
18:1 <sup>Δ9</sup>	-	-
18:1 <sup>Δ11</sup>	-	-
18:2 <sup>Δ9,12</sup>	-	-
18:3 <sup>Δ6,9,12</sup>	-	-
18:3 <sup>Δ5,9,12</sup>	-	-
20:3 <sup>Δ8,11,14</sup>	-	-
20:4 <sup>Δ5,8,11,14</sup>	10,8 ± 0,6	38,0
20:5 <sup>Δ5,8,11,14,17</sup>	46,8 ± 3,6	68,6
22:4 <sup>Δ7,10,13,16</sup>	-	-
22:6 <sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>	-	-

Tabelle 19 zeigt die Substratspezifität der Elongase OtElo2 und OtElo2.1 gegenüber verschiedenen Fettsäuren. OtElo2.1 zeigt eine deutlich höhere Aktivität.

- 5 Die Hefen, die mit dem Vektor pOTE2 bzw. pOTE2.1 transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert.

- 10 Die enzymatische Aktivität, die in Tabelle 19 wiedergegeben wird, zeigt klar, dass OtElo2 bzw. OtElo2.1 eine Δ-6-Elongase ist.

Tabelle 19:

Fettsäuresubstrat	Umsatz (in %) OtElo2	Umsatz (in %) OtE-LO2.2
16:0	-	-
16:1 <sup>Δ9</sup>	-	-
16:3 <sup>Δ7,10,13</sup>	-	-
18:0	-	-
18:1 <sup>Δ6</sup>	-	-
18:1 <sup>Δ9</sup>	-	-
18:1 <sup>Δ11</sup>	-	-
18:2 <sup>Δ9,12</sup>	-	-
18:3 <sup>Δ6,9,12</sup>	15,3	55,7
18:3 <sup>Δ5,9,12</sup>	-	-
18:4 <sup>Δ6,9,12,15</sup>	21,1	70,4
20:2 <sup>Δ11,14</sup>	-	-
20:3 <sup>Δ8,11,14</sup>	-	-
20:4 <sup>Δ5,8,11,14</sup>	-	-
20:5 <sup>Δ5,8,11,14,17</sup>	-	-
22:4 <sup>Δ7,10,13,16</sup>	-	-
22:5 <sup>Δ7,10,13,16,19</sup>	-	-
22:6 <sup>Δ4,7,10,13,16,19</sup>	-	-

Figur 24 A – D zeigt die Elongation von Eicosapentaensäure durch OtElo1 (B) bzw. OtElo1.2 (D). Die Kontrollen (A, C) zeigen nicht das Produkt der Elongation (22:5ω3).

- 5 Figur 25 A – D zeigt die Elongation von Arachidonsäure durch OtElo1 (B) bzw. OtElo1.2 (D). Die Kontrollen (A, C) zeigen nicht das Produkt der Elongation (22:4ω6).

Beispiel 48: Klonierung von Elongase-Genen aus *Euglena gracilis* und *Arabidopsis thaliana*

- 10 Durch Suche nach konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen mit Hilfe der in der Anmeldung aufgeführten Elongase-Gene mit Δ-5-Elongaseaktivität oder Δ-6-Elongaseaktivität konnten Sequenzen aus *Arabidopsis thaliana* bzw. *Euglena gracilis* mit entsprechenden Motiven in Sequenzdatenbanken (Genbank, *Euglena* EST Bank) identifiziert werden. Es handelt sich dabei um die folgenden Sequenzen:

Gen-Name	SEQ ID	Aminosäuren
EGY1019 ( <i>E. gracilis</i> )	SEQ ID NO: 131	262
EGY2019 ( <i>E. gracilis</i> )	SEQ ID NO: 133	262
At3g06460 ( <i>A. thaliana</i> )	SEQ ID NO: 135	298
At3g06470 ( <i>A. thaliana</i> )	SEQ ID NO: 137	278

Die Klonierung der Elongasen aus *Euglena gracilis* wurden wie folgt durchgeführt:

- Der *Euglena gracilis* Stamm 1224-5/25 wurde erhalten von der Sammlung für Algenkulturen Göttingen (SAG). Zur Isolierung wurde der Stamm in Medium II (Calvayrac R and Douce R, FEBS Letters 7:259-262, 1970) für 4 Tage bei 23 °C unter einem Licht-/ Dunkelintervall von 8 h / 16 h (35 mol s<sup>-1</sup> m<sup>-2</sup> Lichtstärke) angezogen.

- Gesamt-RNA von einer viertägigen *Euglena* Kultur wurde mit Hilfe des RNAeasy Kits der Firma Qiagen (Valencia, CA, US) isoliert. Aus der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe von oligo-dT-Cellulose poly-A<sup>+</sup> RNA (mRNA) isoliert (Sambrook et al., 1989). Die RNA wurde mit dem Reverse Transcription System Kit von Promega revers transkribiert und die synthetisierte cDNA in den lambda ZAP Vektor (lambda ZAP Gold, Stratagene) kloniert. Entsprechend der Herstellerangaben wurde die cDNA zur Plasmid-DNA entpackt und Klone wurden zur Zufallssequenzierung ansequenziert. Aus der Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des PolyATract Isolierungssystems (Promega) mRNA isoliert. Die mRNA wurde mit dem Marathon cDNA Amplification-Kit (BD Biosciences) reverse transkribiert und entsprechend der Herstellerangaben wurden die Adaptoren ligiert. Die cDNA-Bank wurde dann für die PCR zur Klonierung von Expressionsplasmiden mittels 5'- und 3'-RACE (rapid amplification of cDNA ends) verwendet.

Die Klonierung der Elongasen aus *Arabidopsis thaliana* wurde wie folgt durchgeführt:

- Ausgehend von der genomischen DNA wurden für die beiden Gene Primer entsprechend am 5'- und 3'-Ende des offenen Leserahmens abgeleitet.

- Zur Isolierung von Gesamt-RNA aus *A. thaliana* wurde nach Chirgwin *et al.*, (1979) verfahren. Blätter von 21 Tage alten Pflanzen wurden in flüssigem Stickstoff zermörsert, mit Aufschlusspuffer versetzt und für 15 min bei 37 °C inkubiert. Nach Zentrifugation (10 min, 4 °C, 12000xg) wurde die RNA im Überstand mit 0,02 Volumen 3 M Natriumacetat pH 5,0 und 0,75 Volumen Ethanol bei -20 °C für 5 h präzipitiert. Die RNA wurde dann nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in 1 mL TES pro g Ausgangsmaterial aufgenommen, einmal mit einem Volumen Phenol-Chloroform und einmal mit einem Volumen Chloroform extrahiert und die RNA mit 2,5 M LiCl gefällt. Nach anschliessendem Zentrifugieren und Waschen mit 80 %igem Ethanol wurde die RNA in Wasser resuspendiert. Entsprechend Sambrook et al. 1989 wurde die cDNA synthetisiert und RT-PCR mit den abgeleiteten Primer durchgeführt. Die PCR-Produkte wurden nach Herstellerangaben in den Vektor pYES2.1-TOPO (Invitrogen) kloniert.

Beispiel 49: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in Hefen:

5 Zur Charakterisierung der Funktion der Elongasen aus *A. thaliana* wurden die offenen Leserahmen der jeweiligen DNAs stromabwärts des Galactose-induzierbaren GAL1-Promotors von pYES2.1/V5-His-TOPO (Invitrogen) kloniert, wobei pAt60 und pAt70 erhalten wurden.

10 Der *Saccharomyces cerevisiae*-Stamm 334 wurde durch Elektroporation (1500 V) mit dem Vektor pAt60 bzw. pAt70 transformiert. Als Kontrolle wurde eine Hefe verwendet, die mit dem leeren Vektor pYES2.1 transformiert wurde. Die Selektion der transformierten Hefen erfolgte auf Komplett-Minimalmedium (CMdum)-Agarplatten mit 2% Glucose, aber ohne Uracil. Nach der Selektion wurden je drei Transformanten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

15 Für die Expression der At-Elongasen wurden zunächst Vorkulturen aus jeweils 5 ml CMdum-Flüssigmedium mit 2% (w/v) Raffinose aber ohne Uracil mit den ausgewählten Transformanten angeimpft und 2 Tage bei 30°C, 200 rpm inkubiert.

5 ml CMdum-Flüssigmedium (ohne Uracil) mit 2% Raffinose und 300 µM verschiedener Fettsäuren wurden dann mit den Vorkulturen auf eine OD<sub>600</sub> von 0,05 angeimpft. Die Expression wurde durch die Zugabe von 2% (w/v) Galactose induziert. Die Kulturen wurden für weitere 96 h bei 20°C inkubiert.

20 Beispiel 50: Expression von pAt60 und pAt70 in Hefen

Hefen, die wie unter Beispiel 5 mit den Plasmiden pYES2.1, pAt60 bzw. pAt70 transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

25 Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethylester (FAMES) durch saure Methanolyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organi-

30 schen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für

35 die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert.

Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum

Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.

5 Beispiel 51: Funktionelle Charakterisierung von pAt60 und pAt70

Die Substratspezifität der Elongasen At3g06460 bzw. At3g06470 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Tab. 20, Fig. 26). Die gefütterten Substrate sind in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der Gene At3g06460 bzw. At3g06470. Dies bedeutet, dass diese Gene funktional exprimiert werden konnte.

Tabelle 20: Elongation von EPA durch die Elongasen At3g06460 bzw. At3g06470. Messung der Hefeextrakte nach Fütterung mit 250  $\mu$ M EPA.

Gen	Gefütterte Fettsäure	Gehalt an C20:5n-3	Gehalt an C22:5n-3
At3g06460	EPA (C20:5n-3)	20,8	0,6
At3g06460	EPA (C20:5n-3)	25,4	1,1
Konversionsrate von EPA		At3g06460: 3,0 %	At3g06470: 4,1 %

Figur 26 gibt die Elongation von 20:5n-3 durch die Elongasen At3g06470 wieder.

15 Beispiel 52: Klonierung einer Elongase aus *Phaeodactylum tricornutum*

Ausgehend von konservierten Bereichen in den Proteinsequenzen mit Hilfe der in der Anmeldung aufgeführten Elongase-Gene mit  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität wurden degenerierte Primer hergestellt und mit diesen eine *Phaeodactylum* cDNA Bank mittels PCR durchsucht. Folgende Primer-Sequenzen wurden eingesetzt:

Primer-Name	Sequenz 5'-3' Orientierung	Korrespondierende Aminosäuren
Phaelo forward1	AA(C/T)CTUCTUTGGCTUTT(C/T)TA (SEQ ID NO. 185)	NLLWLFY
Phaelo reverse1	GA(C/T)TGUAC(A/G)AA(A/G)AA(C/T)TGUG C(A/G)AA (SEQ ID NO. 186)	FAQFFVQS



Nukleotidbasen in Klammern bedeuten, dass eine Mischung von Oligonukleotiden mit jeweils der einen oder anderen Nukleotidbase vorliegen.

#### Herstellung der *Phaeodactylum* cDNA Bank:

- Eine 2 L Kultur von *P. tricornutum* UTEX 646 wurde in f/2 Medium (Guillard, R.R.L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In *Culture of Marine Invertebrate Animals* (Eds. Smith, W.L. and Chanley, M.H.), Plenum Press, New York, pp 29–60.) für 14 d (= Tage) bei einer Lichtstärke von 35 E/cm<sup>2</sup> angezogen. Gefrorene Zellen wurden nach Zentrifugation in der Gegenwart von flüssigem Stickstoff zu einem feinen Pulver gemahlen und mit 2 mL Homogenisierungspuffer (0,33 M Sorbitol, 0,3 M NaCl, 10 mM EDTA, 10 mM EGTA, 2% SDS, 2% Mercaptoethanol in 0,2 M Tris-Cl pH 8,5) resuspendiert. Nach Zugabe von 4 mL Phenol und 2 mL Chloroform wurde 15 min kräftig bei 40-50 °C geschüttelt. Anschliessend wurde zentrifugiert (10 min x 10000g) und die wässrige Phase schrittweise mit Chloroform extrahiert. Nukleinsäuren wurden dann durch Zugabe von 1/20 Volumen 4 M Natriumhydrogencarbonatlösung gefällt und zentrifugiert. Das Pellet wurde in 80 mM Tris-borat pH 7,0 und 1 mM EDTA aufgenommen und die RNA mit 8 M Lithiumchlorid gefällt. Nach Zentrifugation und Waschen mit 70%igem Ethanol wurde das RNA-Pellet mit Rnase-freiem Wasser aufgenommen. Poly(A)-RNA wurde mit Dynabeads (Dynal, Oslo, Norwegen) nach Herstellerangaben isoliert und die Erst-Strang-cDNA-Synthese mit MLV-Rtase von Roche (Mannheim) durchgeführt. Die Zweit-Strang-Synthese erfolgte dann mittels DNA Polymerase I und Klenow Fragment, gefolgt von einem RnaseH Verdau. Die cDNA wurde mit T4 DNA Polymerase behandelt und anschliessend EcoRI/XhoI Adaptoren (Pharmacia, Freiburg) mittels T4 Ligase angehängt. Nach XhoI Verdau, Phosphorylierung und Geltrennung wurden Fragmente grösser als 300 bp entsprechend der Herstellerangaben in den lambda ZAP Express Phagen ligiert (Stratagene, Amsterdam, Niederlande). Nach Massenexcision der cDNA-Bank und Plasmid-Rückgewinnung wurde die Plasmid-Bank in *E. coli* DH10B Zellen transformiert und zur PCR-Sichtung eingesetzt.

Mittels den oben genannten degenerierten Primern konnte das PCR-Fragment mit der Sequenznummer SEQ ID NO: 187 generiert werden.

- 30 Dieses Fragment wurde mit Digoxigenin markiert (Roche, Mannheim) und als Sonde für die Sichtung der Phagen-Bank verwendet.

Mit Hilfe der Sequenz SEQ ID NO: 187 konnte die Gensequenz SEQ ID NO: 183 erhalten werden, die das Volllängen-RNA-Molekül der Δ6-Elongase von *Phaeodactylum* darstellt:

- 35 Beispiel 53: Klonierung von Expressionsplasmiden zur heterologen Expression in - Hefen

Die entsprechenden Primerpaare wurden so ausgewählt, dass sie die Hefe-Konsensus-Sequenz für hocheffiziente Translation (Kozak, Cell 1986, 44:283-292) neben dem Startcodon trugen. Die Amplifizierung der PtELO6-DNA wurde jeweils mit

- 1  $\mu$ L cDNA, 200  $\mu$ M dNTPs, 2,5 U Advantage-Polymerase und 100 pmol eines jeden Primers in einem Gesamtvolumen von 50  $\mu$ l durchgeführt. Die Bedingungen für die PCR waren wie folgt: Erste Denaturierung bei 95°C für 5 Minuten, gefolgt von 30 Zyklen bei 94°C für 30 Sekunden, 55°C für 1 Minute und 72°C für 2 Minuten sowie ein
- 5 letzter Verlängerungsschritt bei 72°C für 10 Minuten.

Für die Klonierung der Sequenz zur heterologen Expression in Hefen wurden folgende Oligonukleotide für die PCR-Reaktion verwendet:

Gen-Name und SEQ ID NO:	Primersequenz
PtELO6 (SEQ ID NO: 183)	F:5'-GCGGCCGCACATAATGATGGTACCTTCAAG (SEQ ID NO: 188)  R:3'- GAAGACAGCTTAATAGACTAGT (SEQ ID NO: 189)

\*F=forward primer, R=reverse primer

- Die PCR Produkte wurden für 30 min bei 21 °C mit dem Hefe-Expressionsvektor -
- 10 pYES2.1-TOPO (Invitrogen) gemäß Herstellerangaben inkubiert. Das PCR-Produkt (siehe SEQ ID NO: 192) wurde dabei durch einen T-Überhang und Aktivität einer Topoisomerase (Invitrogen) in den Vektor ligiert. Nach der Inkubation erfolgte dann die Transformation von E. coli DH5 $\alpha$  Zellen. Entsprechende Klone wurden durch PCR -
- 15 identifiziert, die Plasmid-DNA mittels Qiagen DNAeasy-Kit isoliert und durch Sequenzierung verifiziert. Die korrekte Sequenz wurde dann in den Saccharomyces Stamm INVSc1 (Invitrogen) durch Elektroporation (1500 V) transformiert. Zur Kontrolle wurde der leere Vektor pYES2.1 parallel transformiert. Anschließend wurden die Hefen auf Komplett-Minimalmedium ohne Uracil mit 2 % Glucose ausplattiert. Zellen, die ohne Uracil im Medium wachstumsfähig waren, enthalten damit die entsprechenden
- 20 Plasmide pYES2.1 und pYES2.1-PtELO6. Nach der Selektion wurden je zwei Transformaten zur weiteren funktionellen Expression ausgewählt.

Beispiel 54: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

- Für die Transformation von Pflanzen wird ein weiterer Transformationsvektor auf Basis
- 25 von pSUN-USP erzeugt. Dazu wird mit folgendem Primerpaar NotI-Schnittstellen am 5' und 3'-Ende der kodierenden Sequenz eingefügt:

PSUN-PtELO6

Forward: 5'-GCGGCCGCACCATGATGGTACCTTCAAGTTA (SEQ ID NO: 190)  
Reverse: 3'-GAAGACAGCTTAATAGGCGGCCGC (SEQ ID NO: 191)

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µL):

- 5,00 µL Template cDNA
- 5,00 µL 10x Puffer (Advantage-Polymerase)+ 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 5,00 µL 2mM dNTP
- 5 1,25 µL je Primer (10 pmol/µL)
- 0,50 µL Advantage-Polymerase

Die Advantage-Polymerase von Clontech wurden eingesetzt.

Reaktionsbedingungen der PCR:

- Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C
- 10 Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C
- Elongationstemperatur: 2 min 72°C
- Anzahl der Zyklen: 35

Die PCR Produkte werden für 16 h bei 37 °C mit dem Restriktionsenzym NotI inkubiert. Der Pflanzen-Expressionsvektor pSUN300-USP wird in gleicherweise inkubiert.

- 15 Anschliessend werden die PCR Produkte sowie der 7624 bp große Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgt mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäss Herstellerangaben. Anschließend werden Vektor und PCR-Produkte ligiert. Dazu wird das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmide
- 20 pSUN-PtELO wird durch Sequenzierung verifiziert.

- pSUN300 ist ein Derivat des Plasmides pPZP (Hajdukiewicz, P., Svab, Z., Maliga, P., (1994) The small versatile pPZP family of Agrobacterium binary vectors for plant transformation. Plant Mol Biol 25:989-994). pSUN-USP entstand aus pSUN300, indem in pSUN300 ein USP-Promotor als EcoRI- Fragment inseriert wurde. Das Polyadenylierungssignal ist das des Octopinsynthase-Gens aus dem *A. tumefaciens* Ti-Plasmid (ocs-Terminator, Genbank Accession V00088) (De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J. Nucleotide sequence and transcript map of the Agrobacterium tumefaciens Ti plasmid-encoded octopine synthase gene J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 499-511 (1982). Der USP-Promotor entspricht den Nukleotiden 1-684 (Genbank Accession X56240), wobei ein Teil der nichtcodierenden Region des USP-Gens im Promotor enthalten ist. Das 684 Basenpaar große Promotorfragment wurde mittels käuflichen T7-Standardprimer (Stratagene) und mit Hilfe eines synthetisierten Primers über eine PCR-Reaktion nach Standardmethoden amplifiziert.
- 25
- 30

(Primersequenz: 5'—

- 35 GTCGACCCGCGGACTAGTGGGCCCTCTAGACCCGGGGGATCC  
GGATCTGCTGGCTATGAA-3'; SEQ ID NO: 151).

Das PCR-Fragment wurde mit EcoRI/Sall nachgeschnitten und in den Vektor pSUN300 mit OCS Terminator eingesetzt. Es entstand das Plasmid mit der Bezeich-

nung pSUN-USP. Das Konstrukt wurde zur Transformation von *Arabidopsis thaliana*, Raps, Tabak und Leinsamen verwendet.

Die Lipidextraktion aus Hefen und Samen erfolgte identisch zu Beispiel 6.

Beispiel 55: Expression von PtElo in Hefen

- 5 Hefen, die wie unter Beispiel 4 mit den Plasmiden pYES2 und pYES2-PtELO6 transformiert wurden, wurden folgendermaßen analysiert:

Die Hefezellen aus den Hauptkulturen wurden durch Zentrifugation (100 x g, 5 min, 20°C) geerntet und mit 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 gewaschen, um restliches Medium und Fettsäuren zu entfernen. Aus den Hefe-Zellsedimenten wurden Fettsäuremethyl-  
10 ester (FAMES) durch saure Methanololyse hergestellt. Hierzu wurden die Zellsedimente mit 2 ml 1 N methanolischer Schwefelsäure und 2% (v/v) Dimethoxypropan für 1 h bei 80°C inkubiert. Die Extraktion der FAMES erfolgte durch zweimalige Extraktion mit Petrolether (PE). Zur Entfernung nicht derivatisierter Fettsäuren wurden die organi-  
15 schen Phasen je einmal mit 2 ml 100 mM NaHCO<sub>3</sub>, pH 8,0 und 2 ml Aqua dest. gewaschen. Anschließend wurden die PE-Phasen mit Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getrocknet, unter Argon eingedampft und in 100 µl PE aufgenommen. Die Proben wurden auf einer DB-23-Kapillarsäule (30 m, 0,25 mm, 0,25 µm, Agilent) in einem Hewlett-Packard 6850-Gaschromatographen mit Flammenionisationsdetektor getrennt. Die Bedingungen für die GLC-Analyse waren wie folgt: Die Ofentemperatur wurde von 50°C bis 250°C mit  
20 einer Rate von 5°C/min und schließlich 10 min bei 250°C(halten) programmiert.

Die Identifikation der Signale erfolgte durch Vergleiche der Retentionszeiten mit entsprechenden Fettsäurestandards (Sigma). Die Methodik ist beschrieben zum Beispiel in Napier and Michaelson, 2001, *Lipids*. 36(8):761-766; Sayanova et al., 2001, *Journal of Experimental Botany*. 52(360):1581-1585, Sperling et al., 2001, *Arch. Biochem. Biophys.* 388(2):293-298 und Michaelson et al., 1998, *FEBS Letters*. 439(3):215-218.  
25

Beispiel 56: Funktionelle Charakterisierung von PtELO6:

In Figur 29 ist die Umsetzung von C18:3<sup>Δ8,9,12</sup> und C18:4<sup>Δ8,9,12,15</sup> wiedergegeben. Die Substrate werden um je zwei Kohlenstoffatome elongiert es entstehen jeweils die  
30 Fettsäuren C20:3<sup>Δ8,11,14</sup> bzw. C20:4<sup>Δ8,11,14,17</sup>. Die Substratspezifität von PtELO6 konnte nach Expression und Fütterung verschiedener Fettsäuren ermittelt werden (Fig. 30). Die gefütterten Substrate sind in großen Mengen in allen transgenen Hefen nachzuweisen. Die transgenen Hefen zeigten die Synthese neuer Fettsäuren, den Produkten der PtElo6-Reaktion. Dies bedeutet, dass das Gen PtELO6 funktional exprimiert  
35 werden konnte.

Tabelle 21 zeigt, dass die PtElo6 eine enge Substratspezifität aufweist. PtELO6 konnte nur die C18-Fettsäuren Linolsäure, Linolensäure, γ-Linolensäure und Stearidonsäure elongieren, bevorzugte aber die ω-3-desaturierte Stearidonsäure (siehe auch Figur 30).

Fütterungsexperiment: Fettsäuren (fett) wurden jeweils mit 250  $\mu$ M zugegeben. Die unterstrichenen Fettsäuren wurden neu gebildet.

Tabelle 21: Substratspezifität der PtElo6

gefütterte Fettsäure:		+ 18:2	+ 18:3	+ 18:3	+ 18:4
16:0	16,2	18,2	15,2	20	04:48
16:1	50,6	20,5	22,8	33,5	34,2
18:0	5,4	6,3	6,2	5,2	12,4
18:1	27,7	14,6	19,6	19,3	16,7
18:2		40			
18:3			32,9		
18:3				12,3	
18:4					4,5
20:2		<u>0,4</u>			
20:3			<u>3,4</u>		
20:3				<u>9,7</u>	
20:4					<u>14,5</u>
% Elongation	0,0	0,99	9,37	44,09	76,32

5 Folgende Fettsäuren wurden gefüttert, aber nicht umgesetzt:

- 18:1 <sup>$\Delta 8$</sup> , 18:1 <sup>$\Delta 9$</sup> , 18:1 <sup>$\Delta 11$</sup>
- 20:2 <sup>$\Delta 11,14$</sup> , 20:3 <sup>$\Delta 11,14,17$</sup> , 20:3 <sup>$\Delta 8,11,14$</sup> , 20:4 <sup>$\Delta 5,8,11,14$</sup> , 20:5 <sup>$\Delta 5,8,11,14,17$</sup>
- 22:4 <sup>$\Delta 7,10,13,16$</sup>

10 Die Hefen, die mit dem Vektor pYES2-PtELO6 transformiert worden waren, wurden in Minimalmedium in Gegenwart der angegebenen Fettsäuren kultiviert. Die Synthese der Fettsäuremethylester erfolgte durch saure Methanolyse intakter Zellen. Anschließend wurden die FAMES über GLC analysiert. So wurden die Ergebnisse, die in den Figuren 29 und 30 sowie in der Tabelle 19 dargestellt wurden, ermittelt.

15 Beispiel 57: Klonierung von Expressionsplasmiden zur Samen-spezifischen Expression in Pflanzen

Die folgenden beschriebenen allgemeinen Bedingungen gelten für alle nachfolgenden Versuche, wenn nicht anders beschrieben.

20 Erfindungsgemäß bevorzugt verwendet werden für die folgenden Beispiele Bin19, pBI101, pBinAR, pGPTV und pCAMBIA. Eine Übersicht über binäre Vektoren und ihre Verwendung gibt Hellens et al, Trends in Plant Science (2000) 5, 446–451. Verwendet

wurde ein pGPTV-Derivat wie in DE10205607 beschrieben. Dieser Vektor unterscheidet sich von pGPTV durch eine zusätzlich eingefügte *AscI*-Restriktionsschnittstelle.

Ausgangspunkt der Klonierung war der Klonierungsvektor pUC19 (Maniatis et al.). Im ersten Schritt wurde das Conlinin-Promotor-Fragment mit folgenden Primern amplifiziert:

5

Cnl1 C 5': gaattcggcgcgccgagctcctcgagcaacgggtccggcgggtatagagtgggtaattcga  
Cnl1 C 3': cccgggatcgatgccggcagatctccaccatttttggtggtgat

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

- 5,00 µl Template cDNA  
10 5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>  
5,00 µl 2mM dNTP  
1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)  
0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

- 15 Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C  
Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C  
Elongationstemperatur: 2 min 72°C  
Anzahl der Zyklen: 35

- 20 Das PCR-Produkt wurde zuerst für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* und dann für 12 h bei 25°C mit dem Restriktionsenzym *SmaI* inkubiert. Der Klonierungsvektor pUC19 wurde in gleicher Weise inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der 2668 bp große, geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben.
- 25 Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1-C wurde durch Sequenzierung verifiziert.

- Im nächsten Schritt wurde der OCS-Terminator (Genbank Accession V00088; De Greve, H., Dhaese, P., Seurinck, J., Lemmers, M., Van Montagu, M. and Schell, J.
- 30 Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene J. Mol. Appl. Genet. 1 (6), 499-511 (1982)) aus dem Vektor pGPVT-USP/OCS (DE 102 05 607) mit den folgenden Primern amplifiziert:

- OCS\_C 5': aggcctccatggcctgctttaatgagatatgagagacgcc  
35 OCS\_C 3': cccgggccggacaatcagtaaattgaacggag

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

- 5,00 µl Template cDNA
- 5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 5,00 µl 2mM dNTP
- 5 1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)
- 0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

- Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C
- Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C.
- 10 Elongationstemperatur: 2 min 72°C
- Anzahl der Zyklen: 35

- Das PCR-Produkt wurde zuerst für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Stu*I und dann für 12 h bei 25°C mit dem Restriktionsenzym *Sma*I inkubiert. Der Vektor pUC19-Cnl1-C wurde 12 h bei 25°C mit dem Restriktionsenzym *Sma*I inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1C\_OCS wurde durch Sequenzierung verifiziert.
- 15
- 20

Im nächsten Schritt wurde der Cnl1-B Promotor durch PCR mittels folgender Primer amplifiziert:

Cnl1-B 5': aggcctcaacggtccggcggtatag

Cnl1-B 3': cccgggggtaacgctagcgggcccgcgatccgatttttggtggtgattggtct

- 25 Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

- 5,00 µl Template cDNA
- 5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 5,00 µl 2mM dNTP
- 1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)
- 30 0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

- Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C
- Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C
- Elongationstemperatur: 2 min 72°C
- 35 Anzahl der Zyklen: 35

## 146

Das PCR-Produkt wurde zuerst für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *StuI* und dann für 12 h bei 25°C mit dem Restriktionsenzym *SmaI* inkubiert. Der Vektor pUC19-Cnl1-C wurde 12 h bei 25°C mit dem Restriktionsenzym *SmaI* inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-

- 5 Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1C\_Cnl1B\_OCS wurde durch Sequenzierung verifiziert.

- 10 In einem weiteren Schritt wurde der OCS-Terminator für Cnl1B eingefügt. Dazu wurde die PCR mit folgenden Primer durchgeführt:

OCS2 5': aggcctcctgctttaatgagatatgagagac

OCS2 3': cccgggaggacaatcagtaaattgaacggag

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

- 15 5,00 µl Template cDNA  
5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>  
5,00 µl 2mM dNTP  
1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)  
0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

- 20 Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

- 25 Das PCR-Produkt wurde zuerst für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *StuI* und dann für 12 h bei 25°C mit dem Restriktionsenzym *SmaI* inkubiert. Der Vektor pUC19-Cnl1C\_Cnl1B\_OCS wurde für 12 h bei 25°C mit dem Restriktionsenzym *SmaI* inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente
- 30 ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1C\_Cnl1B\_OCS2 wurde durch Sequenzierung verifiziert.

- 35 Im nächsten Schritt wurde der Cnl1-A Promotor durch PCR mittels folgender Primer amplifiziert:

Cnl1-B 5': aggcctcaacgggtccggcggtatagag

Cnl1-B 3': aggccttctagactgcaggcggccgccgcatttttggtggtgattggt



Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

- 5,00 µl Template cDNA
- 5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 5,00 µl 2mM dNTP
- 5 1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)
- 0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

- Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C
- Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C
- 10 Elongationstemperatur: 2 min 72°C
- Anzahl der Zyklen: 35

- Das PCR-Produkt wurde für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *StuI* inkubiert. Der Vektor pUC19-Cnl1-C wurde für 12 h bei 25°C mit dem Restriktionsenzym *SmaI* inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch
- 15 Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1C\_Cnl1B\_Cnl1A\_OCS2 wurde durch Sequenzierung verifiziert.
- 20 In einem weiteren Schritt wurde der OCS-Terminator für Cnl1A eingefügt. Dazu wurde die PCR mit folgenden Primer durchgeführt:

OCS2 5': ggctctctgctttaatgagatatgcga

OCS2 3': aagcttggcgcgcgcgagctcgtcgacggacaatcagtaaattgaacggaga

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

- 25 5,00 µl Template cDNA
- 5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 5,00 µl 2mM dNTP
- 1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)
- 0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

- 30 Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C  
Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C  
Elongationstemperatur: 2 min 72°C  
Anzahl der Zyklen: 35

- 35 Das PCR-Produkt wurde zuerst für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *StuI* und dann für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *HindIII* inkubiert. Der Vektor

## 148

- pUC19-Cnl1C\_Cnl1B\_Cnl1A\_OCS2 wurde für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *StuI* und für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *HindIII* inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1C\_Cnl1B\_Cnl1A\_OCS3 wurde durch Sequenzierung verifiziert.

- Das Plasmid pUC19-Cnl1C\_Cnl1B\_Cnl1A\_OCS3 wurde im nächsten Schritt zur Klonierung der  $\Delta 6$ -,  $\Delta 5$ -Desaturase und  $\Delta 6$ -Elongase verwendet. Dazu wurde die  $\Delta 6$ -Desaturase aus *Phytium irregulare* (WO02/26946) mit folgenden PCR-Primern amplifiziert:

D6Des(Pir) 5': agatctatggtggacctaagcctggagtg  
D6Des(Pir) 3': ccatggcccgggttacatcgctgggaactcgggtgat

- Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50  $\mu$ l):

- 5,00  $\mu$ l Template cDNA  
5,00  $\mu$ l 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>  
5,00  $\mu$ l 2mM dNTP  
1,25  $\mu$ l je Primer (10 pmol/ $\mu$ l)  
0,50  $\mu$ l Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

- Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C  
Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C  
Elongationstemperatur: 2 min 72°C  
Anzahl der Zyklen: 35

- Das PCR-Produkt wurde zuerst für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *BglII* und dann für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *NcoI* inkubiert. Der Vektor pUC19-Cnl1C\_Cnl1B\_Cnl1A\_OCS3 wurde für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *BglII* und für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *NcoI* inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir) wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Das Plasmid pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir) wurde im nächsten Schritt zur Klonierung der  $\Delta 5$ -Desaturase aus *Thraustochytrium ssp.* (WO02/26946) verwendet. Dazu wurde die  $\Delta 5$ -Desaturase aus *Thraustochytrium ssp.* mit folgenden PCR-Primern amplifiziert:

D5Des(Tc) 5': gggatccatgggcaagggcagcgagggcgg  
 D5Des(Tc) 3': ggccgacaccaagaagcaggactgagatc

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

- 5,00 µl Template cDNA
- 5 5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 5,00 µl 2mM dNTP
- 1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)
- 0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

- 10 Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C
- Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C
- Elongationstemperatur: 2 min 72°C
- Anzahl der Zyklen: 35

- 15 Das PCR-Produkt wurde zuerst für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI und dann für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Eco*RV inkubiert. Der Vektor pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir) wurde für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Bam*HI und für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Eco*RV inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung
- 20 der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc) wurde durch Sequenzierung verifiziert.

- 25 Das Plasmid pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc) wurde im nächsten Schritt zur Klonierung der Δ6-Elongase aus *Physcomitrella patens* (WO01/59128) verwendet, wozu diese mit folgenden PCR-Primern amplifiziert wurde:

D6Elo(Pp) 5': gcggccgcatggaggtcgtggagagattctacggtg  
 D6Elo(Pp) 3': gcaaaagggagctaaaactgagtcatctaga

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

- 30 5,00 µl Template cDNA
- 5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>
- 5,00 µl 2mM dNTP
- 1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)
- 0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

## Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

5 Anzahl der Zyklen: 35

Das PCR-Produkt wurde zuerst für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *NotI* und dann für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *XbaI* inkubiert. Der Vektor pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc) wurde für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *NotI* und für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *XbaI* inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp) wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Ausgehend von pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp) wurde der binäre Vektor für die Pflanzentransformation hergestellt. Dazu wurde pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp) für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *AscI* inkubiert. Der Vektor pGPTV wurde in gleicher Weise behandelt. Anschließend wurden das Fragment aus pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp) und der geschnittene pGPTV-Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pGPTV-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp) wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Ein weiteres Konstrukt, pGPTV-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co), fand Verwendung. Dazu wurde ausgehend von pUC19-Cnl1C\_OCS mit folgenden Primern amplifiziert:

30 Cnl1\_OCS 5': gtcgatcaacgggtccggcggtatagagttg  
Cnl1\_OCS 3': gtcgatcggacaatcagtaaattgaacggaga

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

5,00 µl Template cDNA  
5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>  
35 5,00 µl 2mM dNTP  
1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)  
0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

## Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

5 Anzahl der Zyklen: 35

Das PCR-Produkt wurde für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *SaI* inkubiert. Der Vektor pUC19 wurde für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *SaI* inkubiert.

10 Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1\_OCS wurde durch Sequenzierung verifiziert.

15 In einem weiteren Schritt wurde das  $\Delta 12$ -Desaturase-Gen aus *Calendula officinalis* (WO01/85968) in pUC19-Cnl1\_OCS kloniert. Dazu wurde d12Des(Co) mit folgenden Primern amplifiziert:

D12Des(Co) 5': agatctatgggtgcaggcggtcgaatgc

D12Des(Co) 3': ccatggtaaattctattacgatacc

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50 µl):

20 5,00 µl Template cDNA  
5,00 µl 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM MgCl<sub>2</sub>  
5,00 µl 2mM dNTP  
1,25 µl je Primer (10 pmol/µl)  
0,50 µl Advantage-Polymerase (Clontech)

25 Reaktionsbedingungen der PCR:

Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C

Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C

Elongationstemperatur: 2 min 72°C

Anzahl der Zyklen: 35

30 Das PCR-Produkt wurde für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Bgl*II und anschließend für 2 h bei gleicher Temperatur mit *Nco*I inkubiert. Der Vektor pUC19-Cnl1\_OCS wurde in gleicher Weise inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Fragment und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend

35 wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche

verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1\_D12Des(Co) wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Das Plasmid pUC19-Cnl1\_D12Des(Co), sowie das Plasmid pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp) wurden für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Sa*II inkubiert. Anschließend wurde das Vektor-Fragment sowie der Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und Vektor-Fragment ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co) wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Ausgehend von pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co) wurde der binäre Vektor für die Pflanzentransformation hergestellt. Dazu wurde pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co) für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *As*cl inkubiert. Der Vektor pGPTV wurde in gleicher Weise behandelt. Anschließend wurden das Fragment aus pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co) und der geschnittene pGPTV-Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pGPTV-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co) wurde durch Sequenzierung verifiziert.

Ein weiterer für die Pflanzentransformation geeigneter Vektor ist pSUN2. Um die Zahl der im Vektor enthaltenen Expressionskassetten auf mehr als vier zu erhöhen wurde dieser Vektor in Kombination mit dem Gateway-System (Invitrogen, Karlsruhe) verwendet. Dazu wurde in den Vektor pSUN2 gemäß Herstellerangaben die Gateway-Kassette A wie folgendermassen beschrieben, eingefügt:

Der pSUN2 Vektor (1 µg) wurde 1 h mit dem Restriktionsenzym *Eco*RV bei 37° inkubiert. Anschliessend wurde die Gateway-Kassette A (Invitrogen, Karlsruhe) in den geschnittene Vektor ligiert mittels des Rapid Ligation Kits von Roche, Mannheim. Das entstandene Plasmid wurde in *E. coli* DB3.1 Zellen (Invitrogen) transformiert. Das insolierte Plasmid pSUN-GW wurde anschliessend durch Sequenzierung verifiziert.

Im zweiten Schritt wurde die Expressionskassette aus pUC19-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co) mittels *As*cl ausgeschnitten und in den in gleicherweise behandelten Vektor pSUN-GW ligiert. Das so entstandene Plasmid pSUN-4G wurde für weitere Genkonstrukte verwendet.

Dazu wurde zuerst gemäß Herstellerangaben (Invitrogen) ein pENTR-Klon modifiziert. Das Plasmid pENTR1A (Invitrogen) wurde 1 h bei 37° mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI inkubiert, anschliessend für 30 min mit Klenow-Enzym, sowie einem 1 µM dNTP-Mix

behandelt und dann der *Ascl*-Adapter (5'-ggcgcgcc; am 5'-Ende phosphoryliert, doppelsträngig) in den pENTR1A-Vektor liegiert. In diesen modifizierten wurde wie oben beschrieben schrittweise Gene in die *Cnl*-Kassette eingefügt und über *Ascl* in den pENTR-Vektor übertragen.

- 5 In dieser beschriebenen Art und Weise wurde das Gen TL16y2 aus *Thraustochytrium* ssp. (SEQ ID No. 83) in den pSUN-4G Vektor übertragen:

Das Plasmid pUC19-*Cnl1C\_Cnl1B\_Cnl1A\_OCS3* wurde im nächsten Schritt zur Klonierung der  $\Delta 5$ -Elongase TL16y2 verwendet. Dazu wurde die  $\Delta 5$ -Elongase aus *Thraustochytrium* ssp. mit folgenden PCR-Primern amplifiziert:

- 10 TL16y2 5': agatct atggacgtcgtcgagcagca  
TL16y2 3': ccatggcccggg agaagcagaagaccatctaa

Zusammensetzung des PCR-Ansatzes (50  $\mu$ l):

- 5,00  $\mu$ l Template cDNA  
5,00  $\mu$ l 10x Puffer (Advantage-Polymerase) + 25mM  $MgCl_2$   
15 5,00  $\mu$ l 2mM dNTP  
1,25  $\mu$ l je Primer (10 pmol/ $\mu$ l)  
0,50  $\mu$ l Advantage-Polymerase (Clontech)

Reaktionsbedingungen der PCR:

- Anlagerungstemperatur: 1 min 55°C  
20 Denaturierungstemperatur: 1 min 94°C  
Elongationstemperatur: 2 min 72°C  
Anzahl der Zyklen: 35

- Das PCR-Produkt wurde zuerst für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Bgl*I und dann für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Nco*I inkubiert. Der Vektor pUC19-*Cnl1C\_Cnl1B\_Cnl1A\_OCS3* wurde für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Bgl*I und für 2 h bei 37°C mit dem Restriktionsenzym *Nco*I inkubiert. Anschließend wurden das PCR-Produkt und der geschnittene Vektor durch Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente ausgeschnitten. Die Aufreinigung der DNA erfolgte mittels Qiagen Gel Purification Kit gemäß Herstellerangaben. Anschließend wurden Vektor und PCR-Produkt ligiert. Dazu wurde das Rapid Ligation Kit von Roche verwendet. Das entstandene Plasmid pUC19-*Cnl1\_TL16y2* wurde durch Sequenzierung verifiziert. Anschliessend wurde die Kassette mit *Ascl* ausgeschnitten und in einen mit *Ascl* vorbehandelten pENTR-Vektor ligiert. Das entstandene Plasmid pENTR-*Cnl1\_TL16y2* wurde dann gemäss Herstellerangaben (Invitrogen) in einer Rekombinationsreaktion mit dem Vektor pSUN-4G inkubiert. Das Produkt ergab den Vektor pSUN-5G, der für die Pflanzentransformation eingesetzt wurde.
- 25  
30  
35

- In einem weiteren Schritt wurde das Konstrukt pSUN-8G mittels derselben beschriebenen Methodik erstellt. Dazu wurden 5'- und 3'-Primer für die Gene SEQ ID 41, 53, 87 und 113 mit den oben beschriebenen Restriktionsschnittstellen sowie den ersten und jeweils letzten 20 Nukleotiden des offenen Leserahmens erstellt und mit den Standardbedingungen (siehe oben) amplifiziert und in den pENTR-Cnl-Vektor ligiert.

Durch Rekombinationsreaktion mit dem Vektor pSUN-4G konnte so das Konstrukt pSUN-8G erstellt werden. Auch dieser Vektor wurde für die Pflanzentransformation eingesetzt.

#### 10 Beispiel 58: Erzeugung von transgenen Pflanzen

- a) Erzeugung transgener Sareptasenpflanzen. Es wurde das Protokoll zur Transformation von Rapspflanzen verwendet (verändert nach Moloney et al., 1992, Plant Cell Reports, 8:238-242)

- Zur Erzeugung transgener Pflanzen wurden die erzeugten binäre Vektoren pGPTV-Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co), pSUN-5G und pSUN-8G in *Agrobacterium tumefaciens* C58C1:pGV2260 transformiert (Deblaere et al, 1984, Nucl. Acids. Res. 13, 4777-4788). Zur Transformation von Sareptasenpflanzen wurde eine 1:50 Verdünnung einer Übernachtskultur einer positiv transformierten Agrobakterienkolonie in Murashige-Skoog Medium (Murashige und Skoog 1962 Physiol. Plant. 15, 473) mit 3 % Saccharose (3MS-Medium) verwendet. Petiolen oder Hypokotyledonen frisch gekeimter steriler Pflanzen (zu je ca. 1 cm<sup>2</sup>) wurden in einer Petrischale mit einer 1:50 Agrobakterienverdünnung für 5-10 Minuten inkubiert. Es folgt eine 3-tägige Coinkubation in Dunkelheit bei 25°C auf 3MS-Medium mit 0,8 % Bacto-Agar. Die Kultivierung wurde anschließend mit 16 Stunden Licht / 8 Stunden Dunkelheit und in wöchentlichem Rhythmus auf MS-Medium mit 500 mg/l Claforan (Cefotaxime-Natrium), 50 mg/l Kanamycin, 20 mikroM Benzylaminopurin (BAP) und 1,6 g/l Glukose weitergeführt. Wachsende Sprosse wurden auf MS-Medium mit 2 % Saccharose, 250 mg/l Claforan und 0,8 % Bacto-Agar überführt. Bildeten sich nach drei Wochen keine Wurzeln, so wurde als Wachstumshormon 2-Indolbuttersäure zum Bewurzeln dem Medium zugegeben.

- Regenerierte Sprosse wurden auf 2MS-Medium mit Kanamycin und Claforan erhalten, nach Bewurzelung in Erde überführt und nach Kultivierung für zwei Wochen in einer Klimakammer oder im Gewächshaus angezogen, zur Blüte gebracht, reife Samen geerntet und auf Elongase-Expression wie  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität oder  $\Delta$ -5- oder  $\Delta$ -6-Desaturaseaktivität mittels Lipidanalysen untersucht. Linien mit erhöhten Gehalten an C20- und C22 mehrfach ungesättigten Fettsäuren wurden so identifiziert.

Mit diesem Protokoll wurden auch transgene Rapspflanzen erfolgreich hergestellt.



## b) Herstellung von transgenen Leinpflanzen

Die transgenen Leinpflanzen können zum Beispiel nach der Methode von Bell et al., 1999, *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 35(6):456-465 mittels particle bombardment erzeugt werden. Agrobakterien-vermittelte Transformationen können zum Beispiel  
5 nach Mlynarova et al. (1994), *Plant Cell Report* 13: 282-285 durchgeführt werden.

## Beispiel 59: Lipidextraktion aus Samen:

Die Auswirkung der genetischen Modifikation in Pflanzen auf die Produktion einer gewünschten Verbindung (wie einer Fettsäure) kann bestimmt werden, indem die modifizierte Pflanze unter geeigneten Bedingungen (wie den vorstehend beschriebenen) gezüchtet wird und das Medium und/oder die zellulären Komponenten auf die erhöhte Produktion des gewünschten Produktes (d.h. der Lipide oder einer Fettsäure) untersucht werden. Diese Analysetechniken sind dem Fachmann bekannt und umfassen Spektroskopie, Dünnschichtchromatographie, Färbeverfahren verschiedener Art, enzymatische und mikrobiologische Verfahren sowie analytische Chromatographie, wie Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (siehe beispielsweise  
10 Ullman, *Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Bd. A2, S. 89-90 und S. 443-613, VCH: Weinheim (1985); Fallon, A., et al., (1987) "Applications of HPLC in Biochemistry" in: *Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology*, Bd. 17; Rehm et al. (1993) *Biotechnology*, Bd. 3, Kapitel III: "Product recovery and purification", S. 469-714,  
15 VCH: Weinheim; Belter, P.A., et al. (1988) *Bioseparations: downstream processing for Biotechnology*, John Wiley and Sons; Kennedy, J.F., und Cabral, J.M.S. (1992) *Recovery processes for biological Materials*, John Wiley and Sons; Shaeiwitz, J.A., und Henry, J.D. (1988) *Biochemical Separations*, in: *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*, Bd. B3; Kapitel 11, S. 1-27, VCH: Weinheim; und Dechow, F.J. (1989)  
20 *Separation and purification techniques in biotechnology*, Noyes Publications).

Neben den oben erwähnten Verfahren werden Pflanzenlipide aus Pflanzenmaterial wie von Cahoon et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 (22): 12935-12940, und Browse et al. (1986) *Analytic Biochemistry* 152:141-145 beschrieben extrahiert. Die qualitative und quantitative Lipid- oder Fettsäureanalyse ist beschrieben bei Christie,  
30 William W., *Advances in Lipid Methodology*, Ayr/Scotland: Oily Press (Oily Press Lipid Library; 2); Christie, William W., *Gas Chromatography and Lipids. A Practical Guide* - Ayr, Scotland: Oily Press, 1989, Repr. 1992, IX, 307 S. (Oily Press Lipid Library; 1); "Progress in Lipid Research, Oxford: Pergamon Press, 1 (1952) - 16 (1977) u.d.T.: Progress in the Chemistry of Fats and Other Lipids CODEN.

35 Zusätzlich zur Messung des Endproduktes der Fermentation ist es auch möglich, andere Komponenten der Stoffwechselwege zu analysieren, die zur Produktion der gewünschten Verbindung verwendet werden, wie Zwischen- und Nebenprodukte, um die Gesamteffizienz der Produktion der Verbindung zu bestimmen. Die Analyseverfahren umfassen Messungen der Nährstoffmengen im Medium (z.B. Zucker,  
40 Kohlenwasserstoffe, Stickstoffquellen, Phosphat und andere Ionen), Messungen der

- Biomassezusammensetzung und des Wachstums, Analyse der Produktion üblicher Metabolite von Biosynthesewegen und Messungen von Gasen, die während der Fermentation erzeugt werden. Standardverfahren für diese Messungen sind in Applied Microbial Physiology; A Practical Approach, P.M. Rhodes und P.F. Stanbury, Hrsgb., IRL Press, S. 103-129; 131-163 und 165-192 (ISBN: 0199635773) und darin angegebenen Literaturstellen beschrieben.

Ein Beispiel ist die Analyse von Fettsäuren (Abkürzungen: FAME, Fettsäuremethylester; GC-MS, Gas-Flüssigkeitschromatographie-Massenspektrometrie; TAG, Triacylglycerin; TLC, Dünnschichtchromatographie).

- 10 Der unzweideutige Nachweis für das Vorliegen von Fettsäureprodukten kann mittels Analyse rekombinanter Organismen nach Standard-Analyseverfahren erhalten werden: GC, GC-MS oder TLC, wie verschiedentlich beschrieben von Christie und den Literaturstellen darin (1997, in: Advances on Lipid Methodology, Vierte Aufl.: Christie, Oily Press, Dundee, 119-169; 1998, Gaschromatographie-Massenspektrometrie-Verfahren, Lipide 33:343-353).

- Das zu analysierende Material kann durch Ultraschallbehandlung, Mahlen in der Glasmühle, flüssigen Stickstoff und Mahlen oder über andere anwendbare Verfahren aufgebrochen werden. Das Material muss nach dem Aufbrechen zentrifugiert werden. Das Sediment wird in Aqua dest. resuspendiert, 10 min bei 100°C erhitzt, auf Eis abgekühlt und erneut zentrifugiert, gefolgt von Extraktion in 0,5 M Schwefelsäure in Methanol mit 2 % Dimethoxypropan für 1 Std. bei 90°C, was zu hydrolysierten Öl- und Lipidverbindungen führt, die transmethylierte Lipide ergeben. Diese Fettsäuremethylester werden in Petrolether extrahiert und schließlich einer GC-Analyse unter Verwendung einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 mikrom, 0,32 mm) bei einem Temperaturgradienten zwischen 170°C und 240°C für 20 min und 5 min bei 240°C unterworfen. Die Identität der erhaltenen Fettsäuremethylester muss unter Verwendung von Standards, die aus kommerziellen Quellen erhältlich sind (d.h. Sigma), definiert werden.

- 30 Pflanzenmaterial wird zunächst mechanisch durch Mörsern homogenisiert, um es einer Extraktion zugänglicher zu machen.

- Dann wird 10 min auf 100°C erhitzt und nach dem Abkühlen auf Eis erneut sedimentiert. Das Zellsediment wird mit 1 M methanolischer Schwefelsäure und 2 % Dimethoxypropan für 1h bei 90°C hydrolysiert und die Lipide transmethyliert. Die resultierenden Fettsäuremethylester (FAME) werden in Petrolether extrahiert. Die extrahierten FAME werden durch Gasflüssigkeitschromatographie mit einer Kapillarsäule (Chrompack, WCOT Fused Silica, CP-Wax-52 CB, 25 m, 0,32 mm) und einem Temperaturgradienten von 170°C auf 240°C in 20 min und 5 min bei 240°C analysiert. Die Identität der Fettsäuremethylester wird durch Vergleich mit entsprechenden FAME-Standards (Sigma) bestätigt. Die Identität und die Position der Doppelbindung kann durch geeignete chemische Derivatisierung der FAME-Gemische z.B. zu 4,4-Dimethoxyoxazolin-Derivaten (Christie, 1998) mittels GC-MS weiter analysiert werden.

Beispiel 60: Analyse der Samen von den erzeugten transgenen Pflanzen

Entsprechend Beispiel 59, wurden die Samen der Pflanzen, die mit den Konstrukten pGPTV- Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co), pSUN-5G und pSUN-8G transformiert wurden, analysiert. FigurXX zeigt dabei das Fettsäurespektrum von

- 5 Samen mit dem Konstrukt pGPTV- Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co). Im Vergleich zu Kontroll-Pflanzen, die nicht transformiert wurden (Wildtyp-Kontrolle, WT) konnte eine deutliche Veränderung im Fettsäurespektrum festgestellt werden. Damit konnte gezeigt werden, dass die transformierten Gene funktionell sind. Tabelle 22 fasst die Ergebnisse aus
- 10 Figur 32 zusammen.

Tabelle 22:

Linien	Fettsäuren								
	16:0	18:0	18:1	18:2	GLA	18:3	SDA	ARA	EPA
<b>WT Kontrolle</b>	5,6	6,5	31,7	41,7	nd	12,1	nd	nd	nd
<b>1424_Ko82_4</b>	6,6	1,5	8,9	10,5	42,2	3,1	2,8	17,2	0,2
<b>1424_Ko82_5</b>	6,1	1,5	11,0	9,0	40,6	2,9	4,0	15,0	1,5
<b>1424_Ko82_6</b>	5,7	1,6	15,5	10,6	37,1	3,0	3,2	14,6	0,2
<b>1424_Ko82_7</b>	5,4	2,0	20,4	10,7	32,6	3,5	3,2	12,1	1,0
<b>1424_Ko82_8</b>	5,4	1,4	15,1	12,5	39,9	2,6	2,4	12,2	0,7
<b>1424_Ko82_9</b>	6,0	1,8	25,0	9,9	29,7	2,2	2,5	10,2	0,8
<b>1424_Ko82_10</b>	5,7	1,3	10,1	10,3	42,5	2,6	3,5	13,9	1,1
<b>1424_Ko82_11</b>	5,4	1,4	15,7	11,3	38,2	2,6	2,8	14,1	1,0

- Die Analyse der Samen mit dem Konstrukt pSUN-5G zeigt dabei Linien, die eine deutliche Erhöhung des Gehaltes an Arachidonsäure verglichen mit dem Konstrukt
- 15 pGPTV- Cnl1\_d6Des(Pir)\_d5Des(Tc)\_D6Elo(Pp)\_D12Des(Co) haben. Dabei konnten Linien mit bis zu 25 % ARA erhalten werden. Die zusätzliche Elongase (TL16y2) muss für diesen Effekt verantwortlich sein (Figur31, pSUN-5G). Die Ergebnisse dieser Linie sind in Tabelle 23 zusammengefasst.

Tab. 23: Fettsäureanalytik von transgenen Samen, die mit dem Konstrukt pSUN-5G transformiert wurden.

Linien	Fettsäuren									
	16:0	18:0	18:1	18:2 LA	18:3 GLA	18:3 ALA	18:4 SDA	20:3 HGLA	ARA	EPA
WT	5,2	2,3	34,2	37,9	0,0	11,6	0,0	0,0	0,0	0,0
16-1-2	4,2	1,6	20,1	21,5	25,9	4,1	1,8	1,7	8,9	0,8
16-1-3	5,8	2,3	9,9	14,6	33,6	3,1	2,2	2,2	16,0	1,4
16-1-8	5,0	2,8	11,1	12,6	34,9	2,2	1,8	2,6	16,3	1,2
16-2-1	4,9	1,6	14,5	17,4	32,9	3,5	2,0	1,6	12,3	1,0
16-2-5	5,5	3,3	12,9	13,8	32,9	2,9	2,2	1,4	15,4	1,4
16-4-2	5,8	2,5	18,8	14,7	32,0	3,5	2,3	1,2	12,0	1,2
16-4-3	5,9	2,0	19,7	15,0	32,0	3,8	2,4	1,1	11,4	1,2
16-7-2	6,2	4,4	14,3	10,2	30,7	2,0	2,1	1,7	19,4	1,9
16-7-3	5,0	2,5	21,6	13,6	30,7	2,1	1,8	1,5	12,6	1,1
16-7-4	5,3	4,1	18,8	19,5	23,1	4,2	2,2	2,9	11,3	1,4
16-7-5	7,4	1,8	4,2	6,8	33,7	1,8	2,7	2,6	25,8	2,6

5 Beispiel 61: Nachweis von DHA in Samen von transgenen Sareptasen-Pflanzen.

Samen von Pflanzen, die mit dem Konstrukt pSUN-8G wie unter Beispiel 58 beschrieben hergestellt wurden, wurden wie in Beispiel 59 beschrieben, analysiert. Neben den LCPUFA Arachidonsäure und Eicosapentaensäure konnte in diesen Samen auch Docosahexaensäure nachgewiesen werden, das Produkt nach Umsetzung durch die  $\Delta 4$ -Desaturase aus *Thraustochytrium* und den  $\Delta 5$ -Elongasen aus *Onchorynchis mykiss* und *Ostreococcus tauri*. Figur 32 zeigt das Chromatogramm mit dem geänderten Fettsäurespektrum im Vergleich zu einer nicht-transformierten Kontrollpflanze. In Tabelle 24 sind die Ergebnisse mehrerer Messungen zusammengefasst.

Tabelle. 24 gibt die Fettsäureanalytik von transgenen Samen, die mit dem Konstrukt pSUN-8G transformiert wurden.

- 5 Mit diesem Experiment konnte zum ersten Mal die Synthese von Docosahexaensäure in Samen demonstriert werden. Z.B. in WO 2004/071467 wird zwar die Synthese von DHA in höheren Pflanzen beschrieben, allerdings konnte die Synthese nicht für Samen  
gezeigt werden, nur für eine embryogene Zellkultur.

Äquivalente:

- 10 Der Fachmann erkennt oder kann viele Äquivalente der hier beschriebenen erfindungsgemäßen spezifischen Ausführungsformen feststellen, indem er lediglich Routineexperimente verwendet. Diese Äquivalente sollen von den Patentansprüchen umfasst sein.

Tabelle 2: Verteilung der Fettsäuren in den Samen in drei verschiedenen transgenen *B. juncea* Linien

B. juncea Linien	Nr.	18:1	18:2 (LA)	$\gamma$ 18:3 (GLA)	$\alpha$ 18:3 (ALA)	18:4 (SDA)	20:3 (HGLA)	20:4 (ARA)
WT	1	33,2	38,2	0	12,2	0	0	0
	2	31,3	41,2	0	11,7	0	0	0
8-1424-5	1	25,1	12,8	26,4	3,5	2,4	0,6	8,3
	2	26	12,7	26,3	3,8	2,6	0,6	8,2
	3	25	12,5	25,9	3,4	2,4	0,8	8,5
8-1424-8	1	28,1	13,1	25	5,8	3,7	0,2	6,2
	2	24,7	14,8	26,4	5,2	3	0,3	6,8
8-1424-10	1	25,2	14,2	29,8	5,2	3,4	0,5	5
	2	27,2	12,7	27,9	4,2	2,9	0,3	6,3

Fettsäuremengen wurden in Gew.-% angegeben.

LA = Linolsäure, GLA =  $\gamma$ -Linolensäure, ALA =  $\alpha$ -Linolensäure, SDA = Stearidonsäure, HGLA = Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure, ARA = Arachidonsäure, ETA = Eicosatetraensäure, EPA = Eicosapentaensäure

Tabelle 3: Verteilung der Fettsäuren in den Samen in drei verschiedenen transgenen B. juncea Linien

Probe	Nr.	18:1 $\Delta 9$	18:2 $\Delta 6,9$	18:2 $\Delta 9,12$ (LA)	18:3 $\Delta 6,9,12$ (GLA)	18:3 $\Delta 9,12,15$ (ALA)	18:4 $\Delta 6,9,12,15$ (SDA)	20:3 $\Delta 8,11,14$ (HGLA)	20:4 $\Delta 5,8,11,14$ (ARA)	20:4 $\Delta 8,11,14,17$ (ETA)	20:5 $\Delta 5,8,11,14,17$ (EPA)
WT	1	35,10	0,00	35,71	0,00	10,80	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	27,79	0,00	32,83	0,00	8,94	0,71	0,00	0,00	0,00	0,00
9-1424-1	1	17,62	1,07	12,32	29,92	2,84	2,17	0,97	13,05	<0,01	1,21
	2	23,68	2,17	10,57	23,70	2,39	1,80	0,98	11,60	<0,01	1,16
	3	17,15	0,94	12,86	31,16	3,19	2,40	1,01	12,09	<0,01	1,16
9-1424-5	1	16,48	1,47	11,09	30,49	3,06	2,56	0,75	11,84	<0,01	1,24
	2	17,70	1,23	11,42	27,94	2,35	1,88	0,64	12,30	0,03	1,12
	3	19,29	1,05	10,95	26,11	2,85	2,11	1,07	12,09	<0,01	1,21
9-1424-6	1	24,71	0,00	41,87	0,00	12,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	28,84	0,00	40,65	0,00	10,94	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	29,28	0,00	41,34	0,00	10,76	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00

Probe	Nr.	18:1 $\Delta 9$	18:2 $\Delta 9,12$ $\Delta 6,9$	18:2 $\Delta 9,12$ (LA)	18:3 $\Delta 6,9,12$ (GLA)	18:3 $\Delta 9,12,15$ (ALA)	18:4 $\Delta 6,9,12,15$ (SDA)	20:3 $\Delta 8,11,14$ (HGLA)	20:4 $\Delta 5,8,11,14$ (ARA)	20:4 $\Delta 8,11,14,17$ (ETA)	20:5 $\Delta 5,8,11,14,17$ (EPA)
9-1424-7	1	32,41	0,00	37,26	0,00	10,05	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	27,76	0,00	36,66	0,00	11,43	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	32,03	0,00	36,27	0,00	9,27	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9-1424-8	1	19,08	0,61	11,26	23,31	3,73	2,14	1,11	10,93	0,08	1,11
	2	20,34	3,78	10,07	19,59	2,36	1,72	0,68	8,21	<0,01	1,00
	3	28,27	0,00	37,19	0,00	9,32	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
9-1424-9	1	25,95	0,00	37,87	0,00	9,15	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	2	22,94	0,00	42,69	0,00	9,14	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	3	18,96	0,61	14,09	23,76	3,17	1,86	0,97	10,46	<0,01	0,94

Fettsäuremengen wurden in Gew.-% angegeben.

LA = Linolsäure, GLA =  $\gamma$ -Linolensäure, ALA =  $\alpha$ -Linolensäure, SDA = Stearidonsäure, HGLA = Dihomo- $\gamma$ -Linolensäure, ARA = Arachidonsäure, ETA = Eicosatetraensäure, EPA = Eicosapentaensäure





Tabelle 6: Umsetzungsraten der gefütterten Fettsäuren. Die Konversionsraten wurden berechnet nach der Formel:  

$$[\text{Konversionsrate}] = \frac{[\text{Produkt}]}{[\text{Substrat}] + [\text{Produkt}]} \cdot 100.$$

BioTaur-Klone Fläche in % der GC-Analyse														
Clone	Fett-säure	C16:0	C16:1 (n-7)	C18:0	C18:1 (n-9)	C18:3 (n-6)	C18:4 (n-3)	C20:3 (n-6)	C20:4 (n-6)	C20:4 (n-3)	C20:5 (n-3)	C22:4 (n-6)	C22:4 (n-3)	C22:5 (n-3)
Vector	keine	21.261	41.576	4.670	25.330									
BioTaur	Keine	20.831	37.374	4.215	26.475									
Vector	GLA + EPA	22.053	23.632	5.487	17.289	11.574					13.792			
BioTaur	GLA + EPA	20.439	25.554	6.129	19.587	3.521		6.620			10.149			1.127
Vector	EPA	20.669	28.985	6.292	21.712						16.225			
BioTaur	EPA	20.472	26.913	6.570	23.131						11.519			3.251
Vector	ARA	23.169	23.332	6.587	12.735				27.069					
BioTaur	ARA	20.969	31.281	5.367	21.351				9.648			1.632		
Vector	SDA	18.519	12.626	6.642	6.344		47.911							
BioTaur	SDA	19.683	15.878	7.246	8.403		13.569			25.946			0.876	

Tabelle 24: : Fettsäureanalytik von transgenen Samen, die mit dem Konstrukt pSUN-8G transformiert wurden.

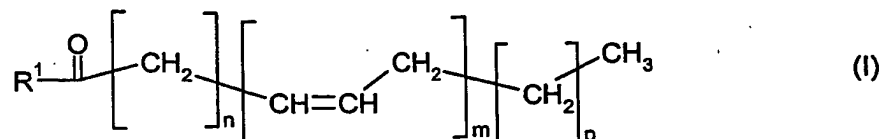
I	16:0	18:0	18:1 Δ9	LA 18:2 Δ9,12	GLA 18:3 Δ6,9,12	ALA 18:3 Δ9,12,15	SDA 18:4 Δ6,9,12,15	HGLA 20:3 Δ8,11,14	ARA 20:4 Δ5,8,11,14	EPA 20:5 Δ5,8,11,14 ,17	22:5 Δ7,10,13,16, 19	DHA 22:6 Δ4,7,10,13,16, 19
WT	5,26	1,80	30,78	43,93	nd	12,47	nd	nd	nd	nd	nd	nd
Bj-17-1-3	4,73	2,28	19,30	14,04	31,48	3,09	2,40	1,70	3,37	8,65	0,19	0,25
Bj-17-2-1	4,34	2,17	17,60	15,56	29,97	3,37	2,44	2,14	4,05	9,14	0,23	0,40
Bj-17-4-3	4,31	1,70	14,45	16,94	35,54	3,43	2,39	0,10	5,09	9,43	0,24	0,23

II	% gesättigte Fettsäuren	% einfach ungesättigte Fettsäuren	% mehrfach ungesättigte Fettsäuren	% LCFAs	% VLCFAs
WT	7,96	35,43	56,62	97,71	2,29
Bj-17-1-3	9,18	24,95	65,87	79,64	20,36
Bj-17-2-1	9,83	25,44	64,73	80,44	19,56
bj-17-4-3	14,05	20,36	65,60	75,27	24,73

LCFAs = alle Fettsäuren bis zu einer Länge von 18 Kohlenstoffatomen in der Fettsäurekette  
 VLCFAs = alle Fettsäuren mit einer Länge ab 20 Kohlenstoffatomen in der Fettsäurekette

## Patentansprüche

## 1. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I

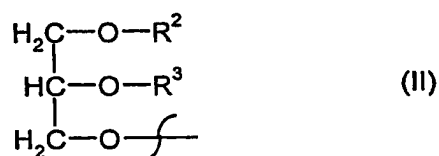


5 im Samen von transgenen Pflanzen mit einem Gehalt von mindestens 20 Gew.-% bezogen auf den Gesamtlipidgehalt, dass es folgende Verfahrensschritte umfasst:

- a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -9-Elongase- oder eine  $\Delta$ -6-Desaturase-Aktivität codiert, und
- 10 b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -8-Desaturase- oder eine  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität codiert, und
- c) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -5-Desaturase-Aktivität codiert, und
- 15 d) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -5-Elongase-Aktivität codiert, und
- e) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in den Organismus, welche für eine  $\Delta$ -4-Desaturase-Aktivität codiert, und

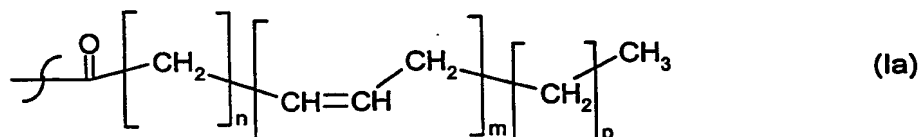
20 wobei die Variablen und Substituenten in der Formel I die folgende Bedeutung haben:

25  $R^1 =$  Hydroxyl-, CoenzymA-(Thioester), Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol-, Sphingobase-, oder einen Rest der allgemeinen Formel II



$R^2 =$  Wasserstoff-, Lyso-Phosphatidylcholin-, Lyso-Phosphatidylethanolamin-, Lyso-Phosphatidylglycerol-, Lyso-Diphosphatidylglycerol-, Lyso-Phosphatidylserin-, Lyso-Phosphatidylinositol- oder gesättigtes oder ungesättigtes  $C_2$ - $C_{24}$ -Alkylcarbonyl-,

- 5  $R^3 =$  Wasserstoff-, gesättigtes oder ungesättigtes  $C_2$ - $C_{24}$ -Alkylcarbonyl-, - oder  $R^2$  oder  $R^3$  unabhängig voneinander einen Rest der allgemeinen Formel Ia:



$n = 2, 3, 4, 5, 6, 7$  oder  $9$ ,  $m = 2, 3, 4, 5$  oder  $6$  und  $p = 0$  oder  $3$ .

- 10 2. Verfahren gemäß Anspruch 1, wobei die Variablen  $n$ ,  $m$  und  $p$  die folgende Bedeutung haben:
- $n = 2, 3$  oder  $5$ ,  $m = 4, 5$  oder  $6$  und  $p = 0$  oder  $3$ .
- 15 3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass in der Formel I  $m = 4$ ,  $n = 3$ ,  $p = 3$  und die Verbindung Arachidonsäure ist und/oder  $m = 5$ ,  $n = 3$ ,  $p = 0$  und die Verbindung Eicosapentaensäure ist und/oder  $m = 5$ ,  $n = 5$ ,  $p = 0$  und die Verbindung Docosapentaensäure ist und/oder  $m = 6$ ,  $n = 3$ ,  $p = 0$  und die Verbindung Docosahexaensäure ist.
- 20 4. Verfahren gemäß den Ansprüchen 2 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass im Samen der transgenen Pflanze der Gehalt aller Verbindungen der Formel I zusammengekommen mindestens 27 Gew.-% bezogen auf den Gesamtlipidgehalt beträgt.
5. Verfahren gemäß den Ansprüchen 2 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass im Samen der transgenen Pflanze der Gehalt an Docosahexaensäure mindestens 1 Gew.-% bezogen auf den Gesamtlipidgehalt beträgt.
- 25 6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität codieren, ausgewählt sind aus der Gruppe bestehend aus:
- 30 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31,

5 SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID  
 NO: 41, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49,  
 SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID  
 NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71,  
 SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID  
 NO: 81, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91,  
 SEQ ID NO: 93, SEQ ID NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID  
 NO: 101, SEQ ID NO: 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO:  
 10 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO:  
 135, SEQ ID NO: 137, SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO:  
 197, SEQ ID NO: 199 oder SEQ ID NO: 201 dargestellten Sequenz, oder

b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten geneti-  
 schen Codes von den in SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ  
 ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO:  
 15 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ  
 ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO:  
 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ  
 ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO:  
 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ  
 ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO:  
 20 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ  
 ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO:  
 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102,  
 SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118,  
 25 SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136,  
 SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 198,  
 SEQ ID NO: 200 oder SEQ ID NO: 202 dargestellten Aminosäuresequen-  
 zen ableiten lassen, oder

c) Derivate der in SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 7,  
 SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 15, SEQ ID  
 NO: 17, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 21, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 25,  
 SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 33, SEQ ID  
 NO: 35, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 43,  
 SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID  
 NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65,  
 SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 73, SEQ ID  
 NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 83,  
 SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91, SEQ ID NO: 93, SEQ ID  
 NO: 95, SEQ ID NO: 97, SEQ ID NO: 99, SEQ ID NO: 101, SEQ ID NO:  
 103, SEQ ID NO: 111, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO:  
 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137  
 40 SEQ ID NO: 183, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 oder  
 SEQ ID NO: 201 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide

- mit mindestens 40 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 84, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 88, SEQ ID NO: 92, SEQ ID NO: 94, SEQ ID NO: 96, SEQ ID NO: 98, SEQ ID NO: 100, SEQ ID NO: 102, SEQ ID NO: 104, SEQ ID NO: 112, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138, SEQ ID NO: 184, SEQ ID NO: 194, SEQ ID NO: 198, SEQ ID NO: 200 oder SEQ ID NO: 202 codieren und eine  $\Delta$ -9-Elongase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- oder  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität aufweisen.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich in die transgene Pflanze eine Nukleinsäuresequenz eingebracht wird, die für Polypeptide mit  $\omega$ 3-Desaturasaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 87 oder SEQ ID NO: 105 dargestellten Sequenz, oder
  - b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 88 oder SEQ ID NO: 106 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
  - c) Derivate der in SEQ ID NO: 87 oder SEQ ID NO: 105 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 60 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 88 oder SEQ ID NO: 106 codieren und eine  $\omega$ 3-Desaturasaktivität aufweisen.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich in die transgene Pflanze eine Nukleinsäuresequenz eingebracht wird, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -12-Desaturasaktivität codiert, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus:
- a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109 oder SEQ ID NO: 195 dargestellten Sequenz, oder

- b) Nukleinsäuresequenzen, die sich als Ergebnis des degenerierten genetischen Codes von der in SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110 oder SEQ ID NO: 196 dargestellten Aminosäuresequenz ableiten lassen, oder
- 5 c) Derivate der in SEQ ID NO: 107, SEQ ID NO: 109 oder SEQ ID NO: 195 dargestellten Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit mindestens 60 % Identität auf Aminosäureebene mit SEQ ID NO: 108, SEQ ID NO: 110 oder SEQ ID NO: 196 codieren und eine  $\Delta$ -12-Desaturasaktivität aufweisen.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass zusätzlich in die transgene Pflanze eine Nukleinsäuresequenz eingebracht wird, die für Proteine des Biosyntheseweges des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels codiert
- 10 ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen oder Fettsäure-Elongase(n).
- 15
10. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Substituenten R<sup>2</sup> oder R<sup>3</sup> unabhängig voneinander gesättigtes oder ungesättigtes
- 20 C<sub>18</sub>-C<sub>22</sub>-Alkylcarbonyl- bedeuten.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass die Substituenten R<sup>2</sup> oder R<sup>3</sup> unabhängig voneinander ungesättigtes C<sub>18</sub>-, C<sub>20</sub>- oder C<sub>22</sub>-Alkylcarbonyl- mit mindestens zwei Doppelbindungen bedeuten.
12. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass die
- 25 transgene Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe einer Öl-produzierenden Pflanze, einer Gemüsepflanze oder Zierpflanze.
13. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die transgene Organismus eine transgene Pflanze ausgewählt aus der Gruppe der Pflanzenfamilien:
- 30 Anacardiaceae, Asteraceae, Boraginaceae, Brassicaceae, Cannabaceae, Compositae, Cruciferae, Cucurbitaceae, Elaeagnaceae, Euphorbiaceae, Fabaceae, Geraniaceae, Gramineae, Leguminosae, Linaceae, Malvaceae, Moringaceae, Marchantiaceae, Onagraceae, Olacaceae, Oleaceae, Papaveraceae, Piperaceae, Pedaliaceae, Poaceae oder Solanaceae ist.
14. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindungen der allgemeinen Formel I aus dem Organismus in Form ihrer Öle, Lipide oder freien Fettsäuren isoliert werden.
- 35



15. Verfahren zur Herstellung von Verbindungen der allgemeinen Formel I gemäß Anspruch 1 in transgenen Pflanzen, umfassend:

- 5 a) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in eine Pflanze, welche für ein Polypeptid mit einer  $\Delta$ -6-Desaturase-Aktivität kodiert und ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
- i) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 193 oder SEQ ID NO: 201 dargestellten Sequenz,
  - 10 ii) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID NO: 194 oder SEQ ID NO: 202 angegebene Aminosäuresequenz kodieren,
  - iii) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID NO: 193 oder SEQ ID NO: 201 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und
  - iv) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID NO: 193 oder SEQ ID NO: 201 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind,
- 15 b) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in eine Pflanze, welche für ein Polypeptid mit einer  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität kodiert und ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
- i) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 199 dargestellten Sequenz,
  - 20 ii) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID NO: 28 oder SEQ ID NO: 200 angegebene Aminosäuresequenz kodieren,
  - iii) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 199 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und
  - 25 iv) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID NO: 27 oder SEQ ID NO: 199 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind, und
- 30 c) Einbringen mindestens einer Nukleinsäuresequenz in eine Pflanze, welche für ein Polypeptid mit einer  $\Delta$ -5-Desaturase-Aktivität kodiert und ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
- i) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 11 dargestellten Sequenz,
  - ii) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID NO: 12 angegebene Aminosäuresequenz kodieren,
  - 35 iii) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID NO: 11 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und

- iv) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID NO: 11 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind,

wobei die Variablen und Substituenten in der Formel I die in Anspruch 1 genannte Bedeutung haben.

- 5 16. Verfahren nach Anspruch 15, wobei die Substituenten  $R^2$  oder  $R^3$  unabhängig voneinander gesättigtes oder ungesättigtes  $C_{10}$ - $C_{22}$ -Alkylcarbonyl bedeuten.
17. Verfahren nach einem der Ansprüche 15 oder 16, wobei die Substituenten  $R^2$  oder  $R^3$  unabhängig voneinander ungesättigtes  $C_{18}$ -,  $C_{20}$ - oder  $C_{22}$ -Alkylcarbonyl mit mindestens zwei Doppelbindungen bedeuten.
- 10 18. Verfahren nach den Ansprüchen 15 bis 17, wobei zusätzlich eine Nukleinsäuresequenz in die Pflanze eingebracht wird, die für ein Polypeptid mit einer  $\Delta$ -12-Desaturase-Aktivität kodiert.
19. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
  - 15 a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 195 dargestellten Sequenz,
  - b) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID NO: 196 angegebene Aminosäuresequenz kodieren,
  - 20 c) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID No. 195 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und
  - d) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID NO: 195 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind.
- 25 20. Verfahren nach Anspruch 18, wobei die  $\Delta$ -12-Desaturase unter der Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimiert wird.
21. Verfahren nach den Ansprüchen 15 bis 20, wobei zusätzlich eine Nukleinsäuresequenz in die Pflanze eingebracht wird, die für ein Polypeptid mit einer  $\Delta$ -5-Elongase-Aktivität kodiert.
- 30 22. Verfahren nach Anspruch 21, wobei die Nukleinsäuresequenz ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus:
  - a) einer Nukleinsäuresequenz mit der in SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID

## 173

NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 197 dargestellten Sequenz,

- 5      b) Nukleinsäuresequenzen, die für die in SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 86, SEQ ID NO: 114, SEQ ID NO: 118, SEQ ID NO: 120, SEQ ID NO: 132, SEQ ID NO: 134, SEQ ID NO: 136, SEQ ID NO: 138 oder SEQ ID NO: 198 angegebene Aminosäuresequenz kodieren,
- 10
- 15      c) Nukleinsäuresequenzen, die mit dem komplementären Strang der in SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 197 angegebenen Nukleinsäuresequenz unter stringenten Bedingungen hybridisieren, und
- 20      d) Nukleinsäuresequenzen, die zu der in SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 85, SEQ ID NO: 113, SEQ ID NO: 117, SEQ ID NO: 119, SEQ ID NO: 131, SEQ ID NO: 133, SEQ ID NO: 135, SEQ ID NO: 137 oder SEQ ID NO: 197 angegebenen Sequenz zu mindestens 60% identisch sind.
- 25
23. Verfahren nach Anspruch 21, wobei die  $\Delta$ -5-Elongase unter der Kontrolle eines samenspezifischen Promotors exprimiert wird.
24. Verfahren nach den Ansprüchen 12 bis 24, wobei alle Nukleinsäuresequenzen auf einem gemeinsamen rekombinanten Nukleinsäuremolekül in die Pflanzen
- 30      eingebracht werden.
25. Verfahren nach Anspruch 24, wobei jede Nukleinsäuresequenz unter Kontrolle eines eigenen Promotors steht.
26. Verfahren nach Anspruch 25, wobei es sich bei dem eigenen Promotor um einen samenspezifischen Promotor handelt.
- 35      27. Verfahren nach den Ansprüchen 15 bis 26, wobei in der Formel I  $m = 4$ ,  $n = 3$ ,  $p = 3$  und die Verbindung Arachidonsäure ist und/oder  $m = 5$ ,  $n = 3$ ,  $p = 0$  und die Verbindung Eicosapentaensäure ist und/oder  $m = 6$ ,  $n = 3$ ,  $p = 0$  und die Verbindung Docosahexaensäure ist.

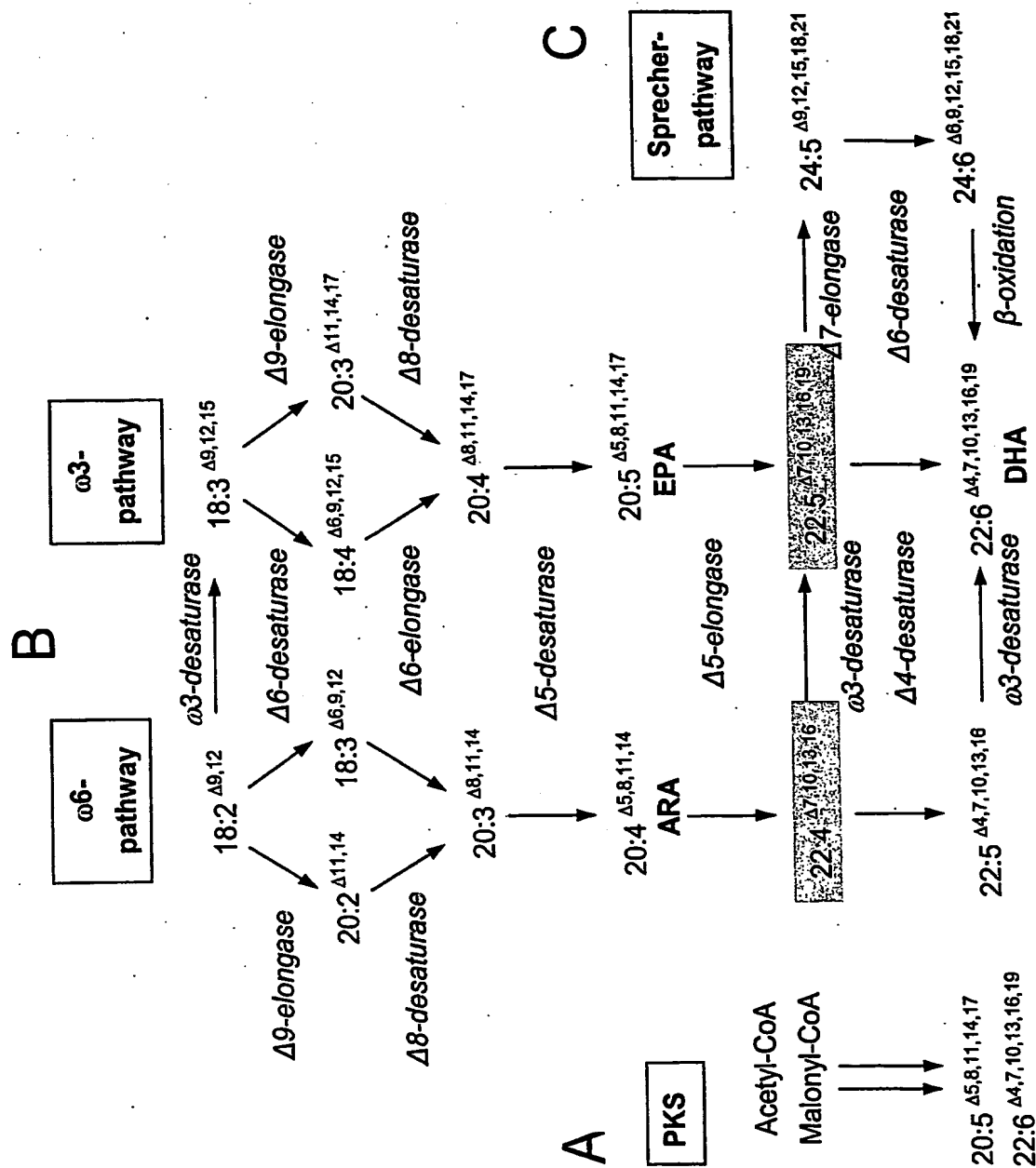
28. Verfahren nach den Ansprüchen 15 bis 27, wobei es sich bei der Pflanze um eine Ölsamen- oder Ölfruchtpflanze handelt.
29. Verfahren nach Anspruch 28, wobei die Pflanze ausgewählt ist aus der Gruppe bestehend aus Soja, Erdnuss, Raps, Canola, Lein, Nachtkerze, Königskerze, Distel, Haselnuss, Mandel, Macadamia, Avocado, Lorbeer, Wildrosen, Kürbis, Pistazien, Sesam, Sonnenblume, Färberdistel, Borretsch, Mais, Mohn, Senf, Hanf, Rhizinus, Olive, Calendula, Punica, Ölpalme, Walnuss und Kokosnuss.
30. Verfahren nach Anspruch 28 oder 29, wobei die Pflanze *Brassica juncea* ist.
31. Verfahren nach den Ansprüchen 15 bis 30, wobei die Verbindungen der Formel I in Form ihrer Öle, Lipide und freien Fettsäuren aus der Pflanze gewonnen werden.
32. Verfahren nach Anspruch 31, wobei aus den Verbindungen der Formel I ungesättigte oder gesättigte Fettsäuren freigesetzt werden.
33. Verfahren nach Anspruch 32, wobei die Freisetzung durch alkalische Hydrolyse oder enzymatische Abspaltung erfolgt.
34. Verfahren nach den Ansprüchen 15 bis 33, wobei die Konzentration an Arachidonsäure mindestens 25%, bezogen auf den gesamten Lipidgehalt der transgenen Pflanze, beträgt.
35. Verfahren nach den Ansprüchen 15 bis 33, wobei die Konzentration an Eicosa-pentaensäure mindestens 15%, bezogen auf den gesamten Lipidgehalt der transgenen Pflanze, beträgt.
36. Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon, erhalten durch ein Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche.
37. Verwendung einer  $\Delta$ -12-Elongase, einer  $\Delta$ -6-Desaturase, einer  $\Delta$ -5-Desaturase, einer  $\Delta$ -6-Elongase und  $\Delta$ -5-Elongase, wie in Anspruch 15, 18 oder 21 definiert, zur Herstellung von Verbindungen der Formel I gemäß Anspruch 1.
38. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül, umfassend:
- a) eine oder mehrere Kopien eines in Pflanzenzellen, bevorzugt in Samenzellen, aktiven Promotors,
  - b) mindestens eine Nukleinsäuresequenz wie in Anspruch 15 definiert, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase-Aktivität kodiert,
  - c) mindestens eine Nukleinsäuresequenz wie in Anspruch 15 definiert, die für eine  $\Delta$ -5-Desaturase-Aktivität kodiert,
  - d) mindestens eine Nukleinsäuresequenz enthält wie in Anspruch 15 definiert, die für eine  $\Delta$ -6-Elongase-Aktivität kodiert, und
  - e) eine oder mehrere Kopien einer Terminatorsequenz.

39. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 38, zusätzlich umfassend eine Nukleinsäuresequenz wie in Anspruch 18 definiert, die für eine  $\Delta$ -12-Desaturase kodiert.
- 5 40. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach Anspruch 38 oder 39, zusätzlich umfassend eine Nukleinsäuresequenz wie in Anspruch 21 definiert, die für eine  $\Delta$ -5-Elongase kodiert.
- 10 41. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach den Ansprüchen 38 bis 40, zusätzlich umfassend Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipooxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyasen und Fettsäure-Elongase(n).
- 15 42. Rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 38 bis 41, zusätzlich enthaltend Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus  $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -8-Desaturase-,  $\Delta$ -9-Desaturase- oder  $\Delta$ -9-Elongase.
- 20 43. Transgene Pflanze enthaltend ein rekombinantes Nukleinsäuremolekül nach einem der Ansprüche 38 bis 42 oder enthaltend die in Anspruch 15 und ggf. zusätzlich die in Anspruch 18 oder 21 definierten Nukleinsäuresequenzen.
- 25 44. Verfahren nach den Ansprüchen 15 bis 35, dadurch gekennzeichnet, dass die Verbindungen der allgemeinen Formel I aus dem Organismus in Form ihrer Öle, Lipide oder freien Fettsäuren isoliert werden.
45. Öl, Lipide oder Fettsäuren oder eine Fraktion davon, hergestellt durch das Verfahren nach einem der Ansprüche 15 bis 35.
- 30 46. Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung, die PUFAs hergestellt nach einem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 14 umfasst und von transgenen Pflanzen stammt.
47. Verfahren zur Herstellung von Ölen, Lipiden oder Fettsäurezusammensetzungen durch Mischen von Öl, Lipide oder Fettsäuren gemäß Anspruch 45 oder Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung gemäß Anspruch 46 mit tierischen oder mikrobiellen Ölen, Lipiden oder Fettsäuren.
- 35 48. Verwendung von Öl, Lipide oder Fettsäuren gemäß Anspruch 45 oder Öl-, Lipid- oder Fettsäurezusammensetzung gemäß Anspruch 46 oder Ölen, Lipiden oder

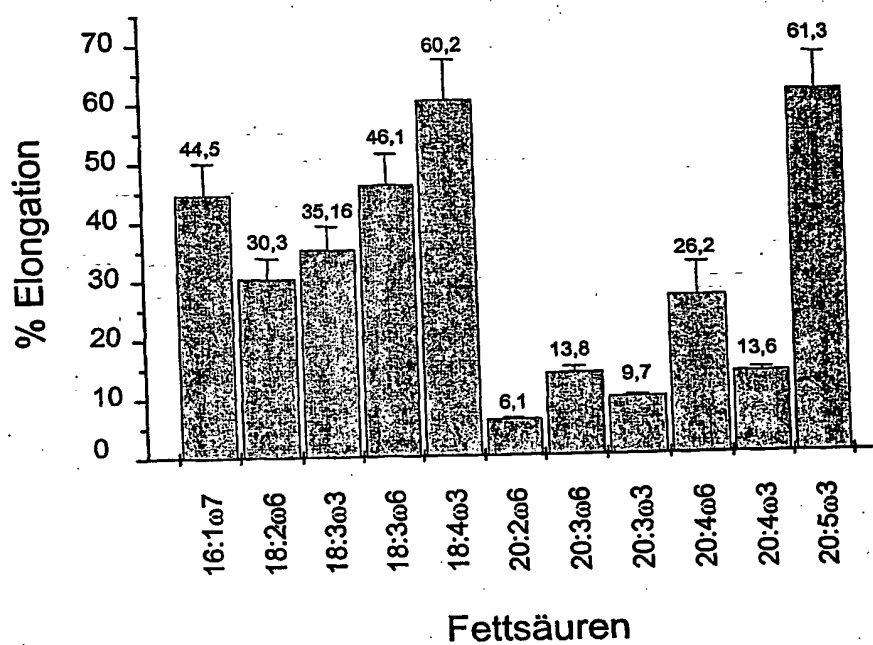
Fettsäurezusammensetzungen hergestellt gemäß Anspruch 46 in Futter, Nahrungsmitteln, Kosmetika oder Pharmazeutika.

49. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität codiert und die in SEQ ID NO: 197 dargestellte Sequenz hat.
- 5 50. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität codiert und die in SEQ ID NO: 199 dargestellte Sequenz hat.
51. Isolierte Nukleinsäuresequenz, die für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturaseaktivität codiert und die in SEQ ID NO: 201 dargestellte Sequenz hat.
- 10 52. Genkonstrukt, enthaltend eine isolierte Nukleinsäure nach einem der Ansprüche 49 bis 51, wobei die Nukleinsäure funktionsfähig mit einem oder mehreren Regulationssignalen verbunden ist.
- 15 53. Genkonstrukt nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, dass das Nukleinsäurekonstrukt zusätzliche Biosynthesegene des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels enthält ausgewählt aus der Gruppe Acyl-CoA-Dehydrogenase(n), Acyl-ACP[= acyl carrier protein]-Desaturase(n), Acyl-ACP-Thioesterase(n), Fettsäure-Acyl-Transferase(n), Acyl-CoA:Lysophospholipid-Acyltransferase(n), Fettsäure-Synthase(n), Fettsäure-Hydroxylase(n), Acetyl-Coenzym A-Carboxylase(n), Acyl-Coenzym A-Oxidase(n), Fettsäure-Desaturase(n), Fettsäure-Acetylenasen, Lipoxygenasen, Triacylglycerol-Lipasen, Allenoxid-Synthasen, Hydroperoxid-Lyase(n) oder Fettsäure-Elongase(n).
- 20 54. Vektor, enthaltend eine Nukleinsäure nach Anspruch 50 oder 51 oder ein Genkonstrukt nach Anspruch 52 oder 53.
- 25 55. Transgene Pflanze, enthaltend mindestens eine Nukleinsäure nach Anspruch 50 oder 51 oder ein Genkonstrukt nach Anspruch 52 oder 53 oder einen Vektor nach Anspruch 54.

Figur 1: Verschiedene Synthesewege zur Biosynthese von DHA (Docosahexaensäure)

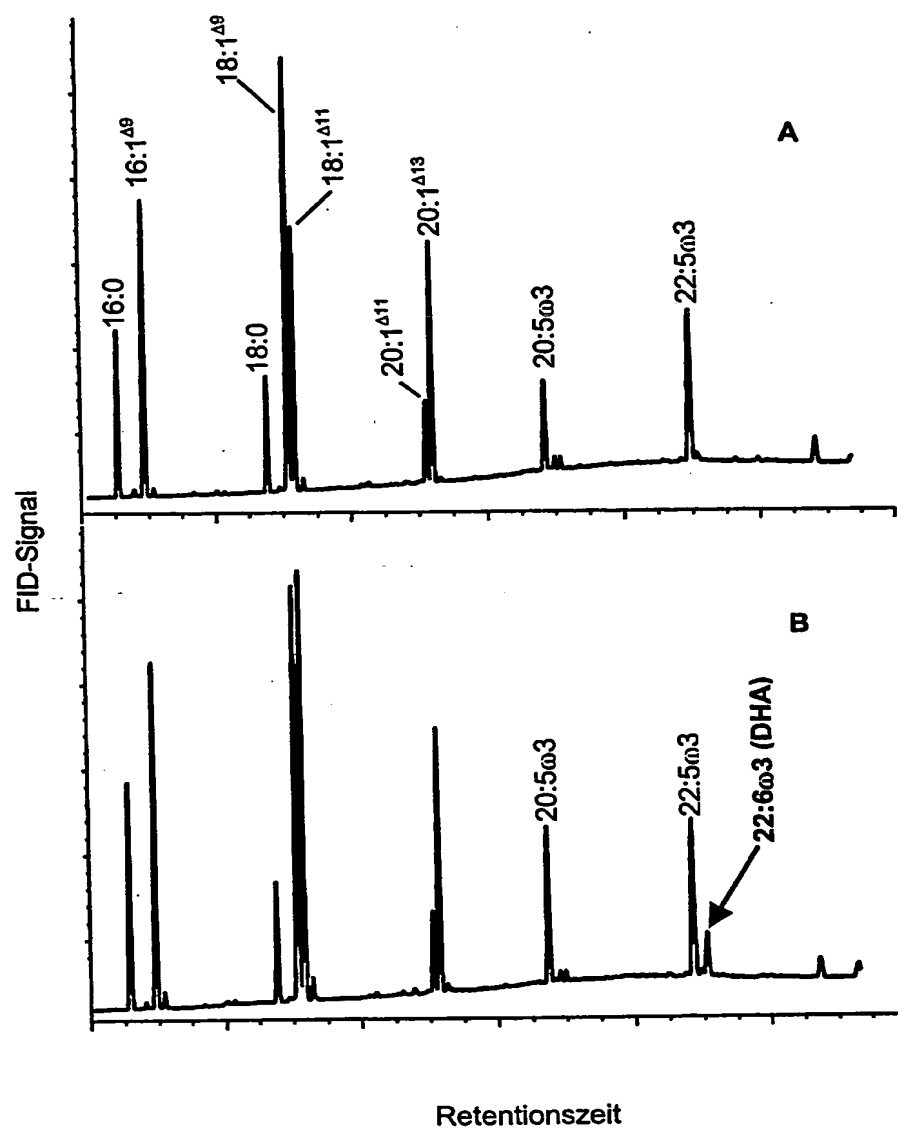


Figur 2: Substratspezifität der  $\Delta$ -5-Elongase (SEQ ID NO: 53) gegenüber verschiedenen Fettsäuren

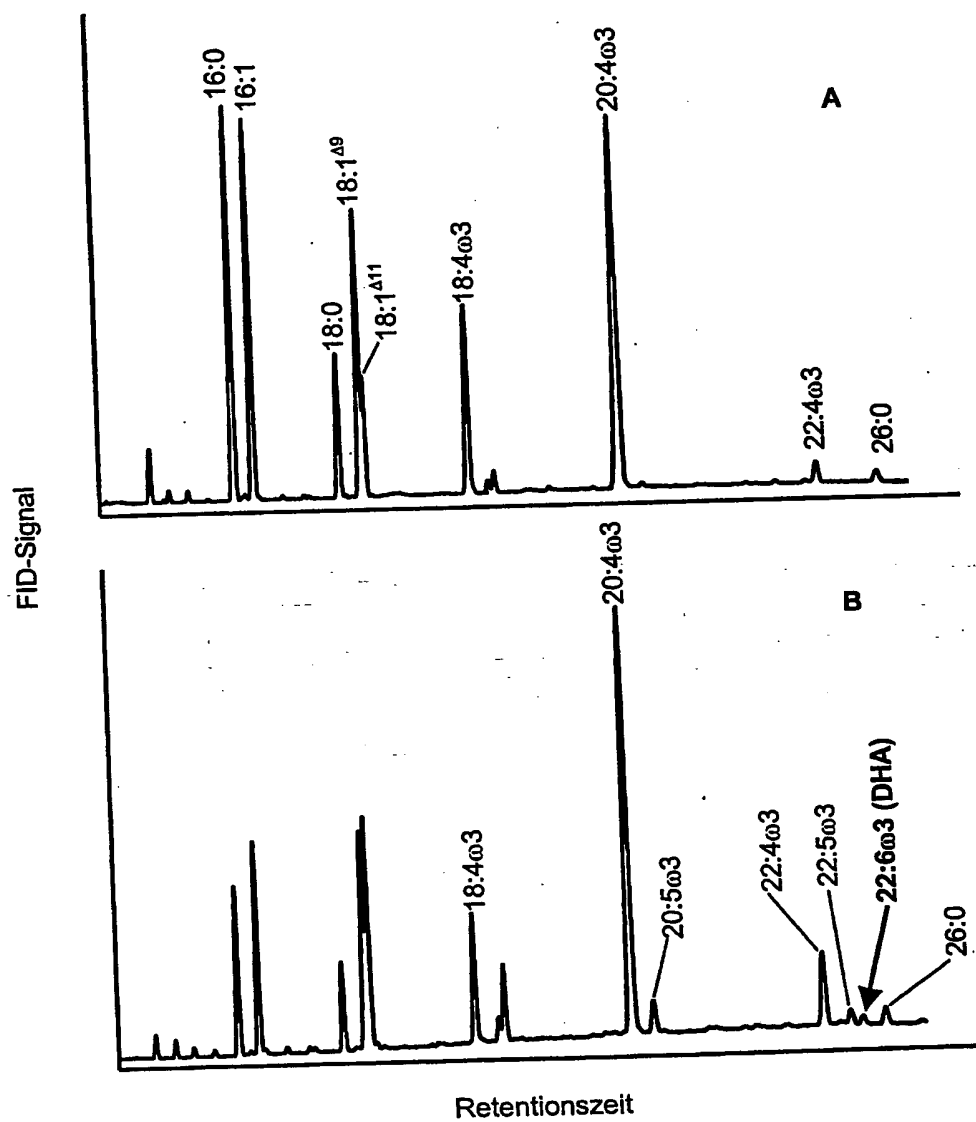




Figur 3: Rekonstitution der DHA-Biosynthese in Hefe ausgehend von 20:5 $\omega$ 3.



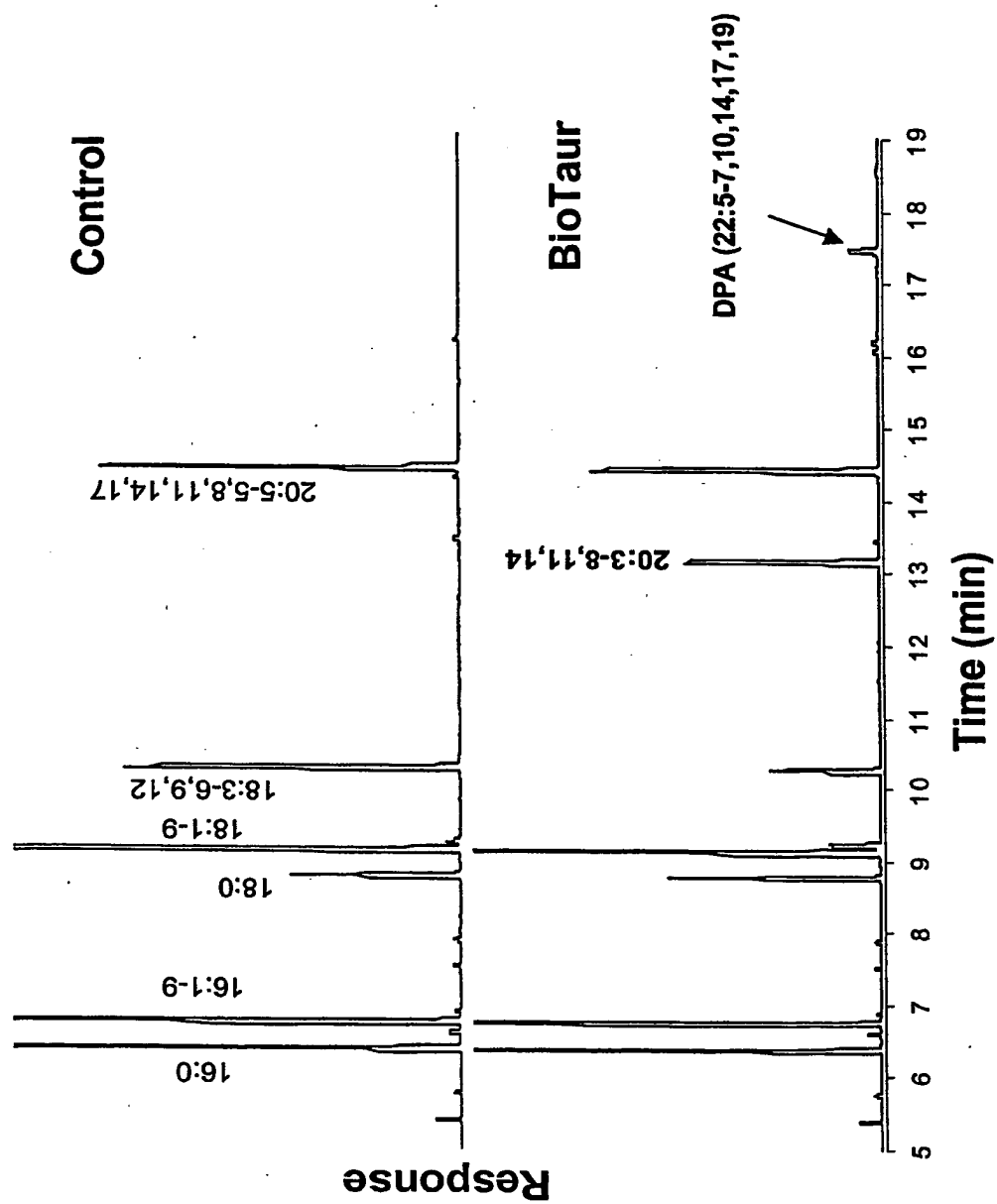
Figur 4: Rekonstitution der DHA-Biosynthese in Hefe ausgehend von 18:4 $\omega$ 3.

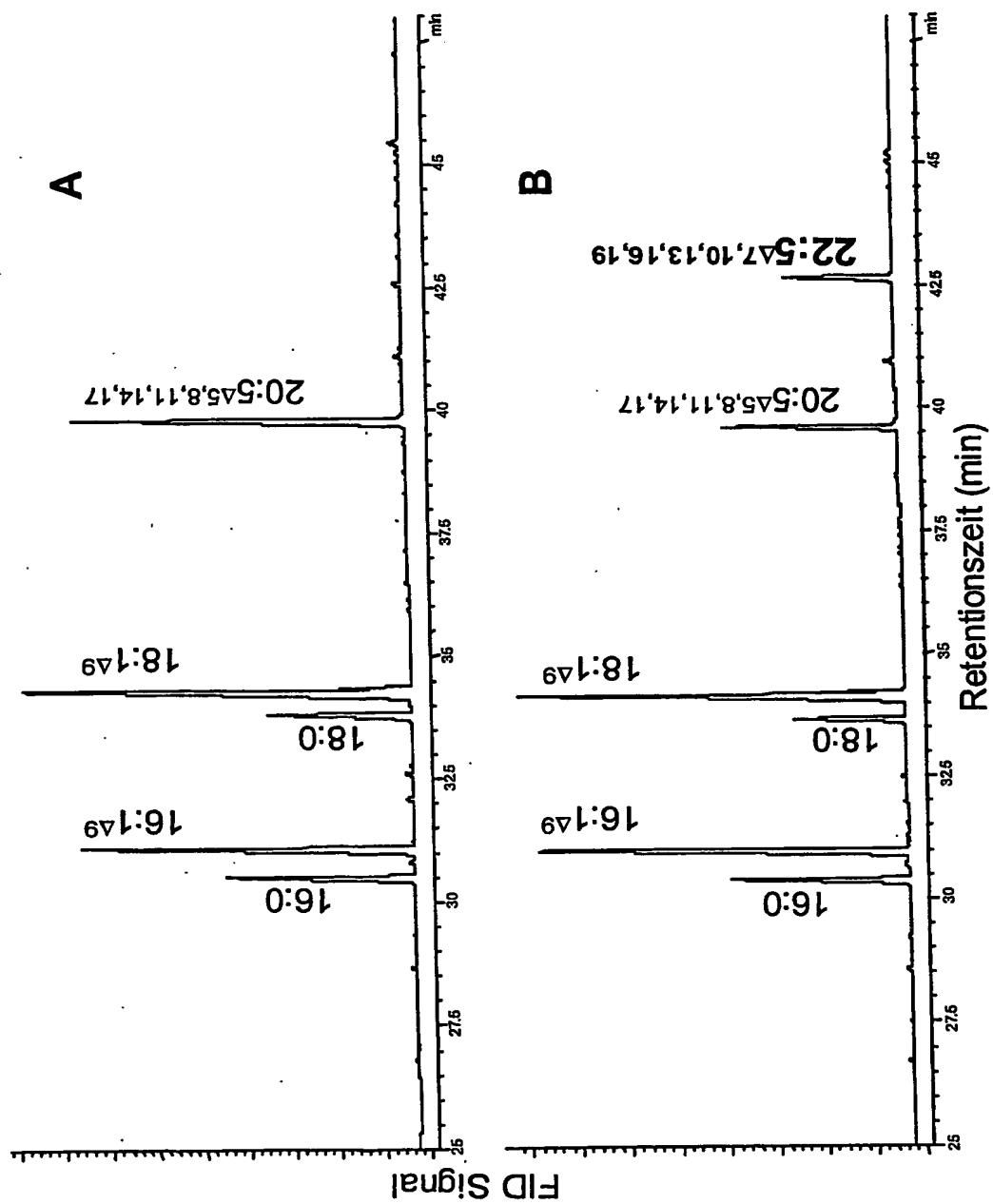


Figur 5: Fettsäure-Zusammensetzung (in Mol %) transgener Hefen, die mit den Vektoren pYes3-OmELO3/pYes2-EgD4 oder pYes3-OmELO3/pYes2-EgD4+pESCLEu-PtD5 transformiert worden waren. Die Hefezellen wurden in Minimalmedium ohne Tryptophan und Uracil / und Leucin in Gegenwart von 250  $\mu$ M 20:5 <sup>$\Delta$ 5,8,11,14,17</sup> bzw. 18:4 <sup>$\Delta$ 6,9,12,15</sup> kultiviert. Die Fettsäuremethylester wurden durch saure Methanolyse aus Zellsedimenten gewonnen und über GLC analysiert. Jeder Wert gibt den Mittelwert (n=4)  $\pm$  Standardabweichung wieder.

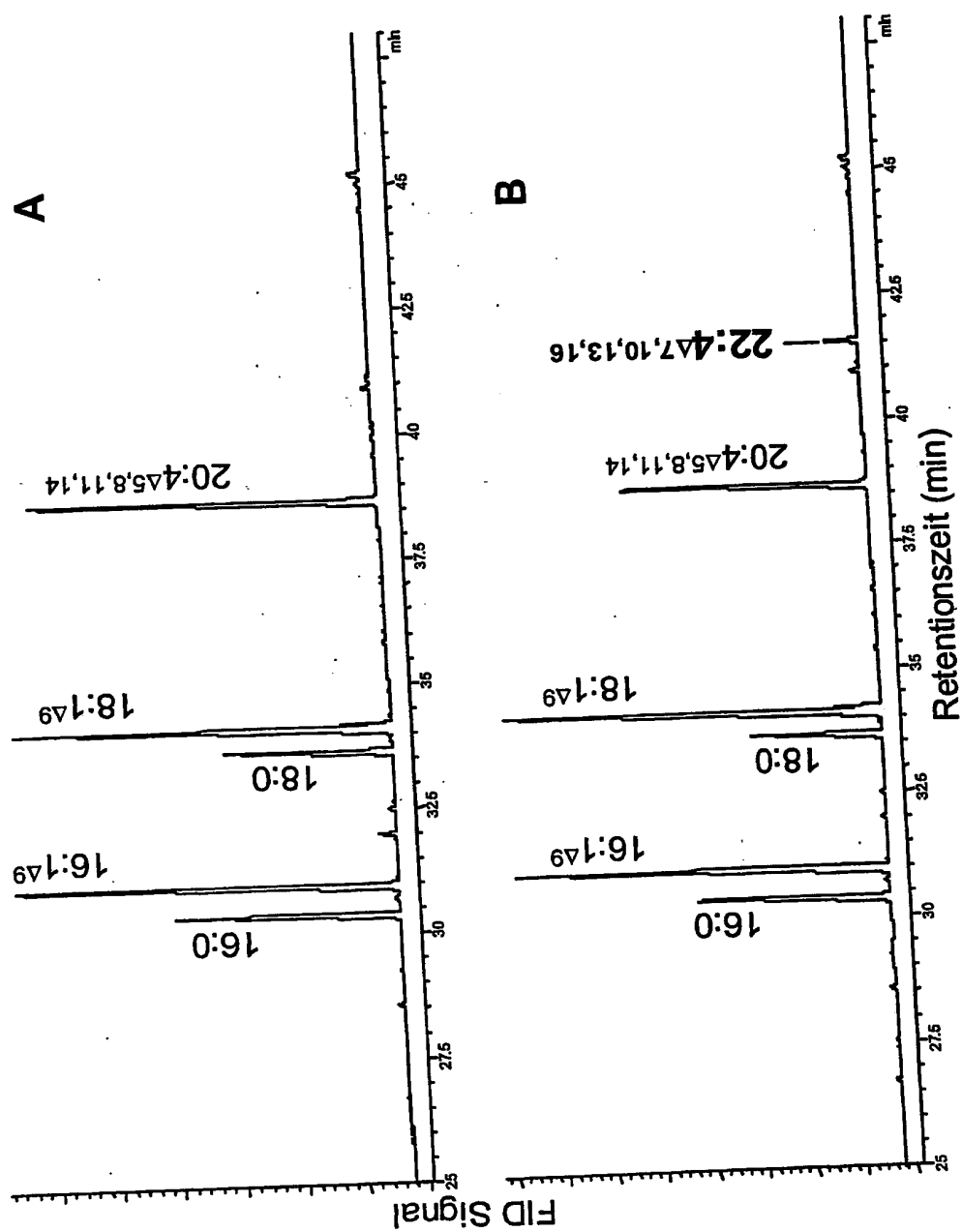
Fettsäuren	pYes3-OmELO/pYes2-EgD4	pYes3-OmELO/pYes2-EgD4 EgD4 + pESCLEu-PtD5
	Fütterung mit 20:5 <sup><math>\Delta</math>5,8,11,14,17</sup>	Fütterung mit 18:4 <sup><math>\Delta</math>6,9,12,15</sup>
16:0	9,35 $\pm$ 1,61	7,35 $\pm$ 1,37
16:1 <sup><math>\Delta</math>9</sup>	14,70 $\pm$ 2,72	10,02 $\pm$ 1,81
18:0	5,11 $\pm$ 1,09	4,27 $\pm$ 1,21
18:1 <sup><math>\Delta</math>9</sup>	19,49 $\pm$ 3,01	10,81 $\pm$ 1,95
18:1 <sup><math>\Delta</math>11</sup>	18,93 $\pm$ 2,71	11,61 $\pm$ 1,48
18:4 <sup><math>\Delta</math>6,9,12,15</sup>	-	7,79 $\pm$ 1,29
20:1 <sup><math>\Delta</math>11</sup>	3,24 $\pm$ 0,41	1,56 $\pm$ 0,23
20:1 <sup><math>\Delta</math>13</sup>	11,13 $\pm$ 2,07	4,40 $\pm$ 0,78
20:4 <sup><math>\Delta</math>8,11,14,17</sup>	-	30,05 $\pm$ 3,16
20:5 <sup><math>\Delta</math>5,8,11,14,17</sup>	6,91 $\pm$ 1,10	3,72 $\pm$ 0,59
22:4 <sup><math>\Delta</math>10,13,16,17</sup>	-	5,71 $\pm$ 1,30
22:5 <sup><math>\Delta</math>7,10,13,16,19</sup>	8,77 $\pm$ 1,32	1,10 $\pm$ 0,27
22:6 <sup><math>\Delta</math>4,7,10,13,16,19</sup>	2,73 $\pm$ 0,39	0,58 $\pm$ 0,10

Figur 6: Fütterungsexperiment zur Bestimmung der Funktionalität und Substratspezifität mit Hefestämmen

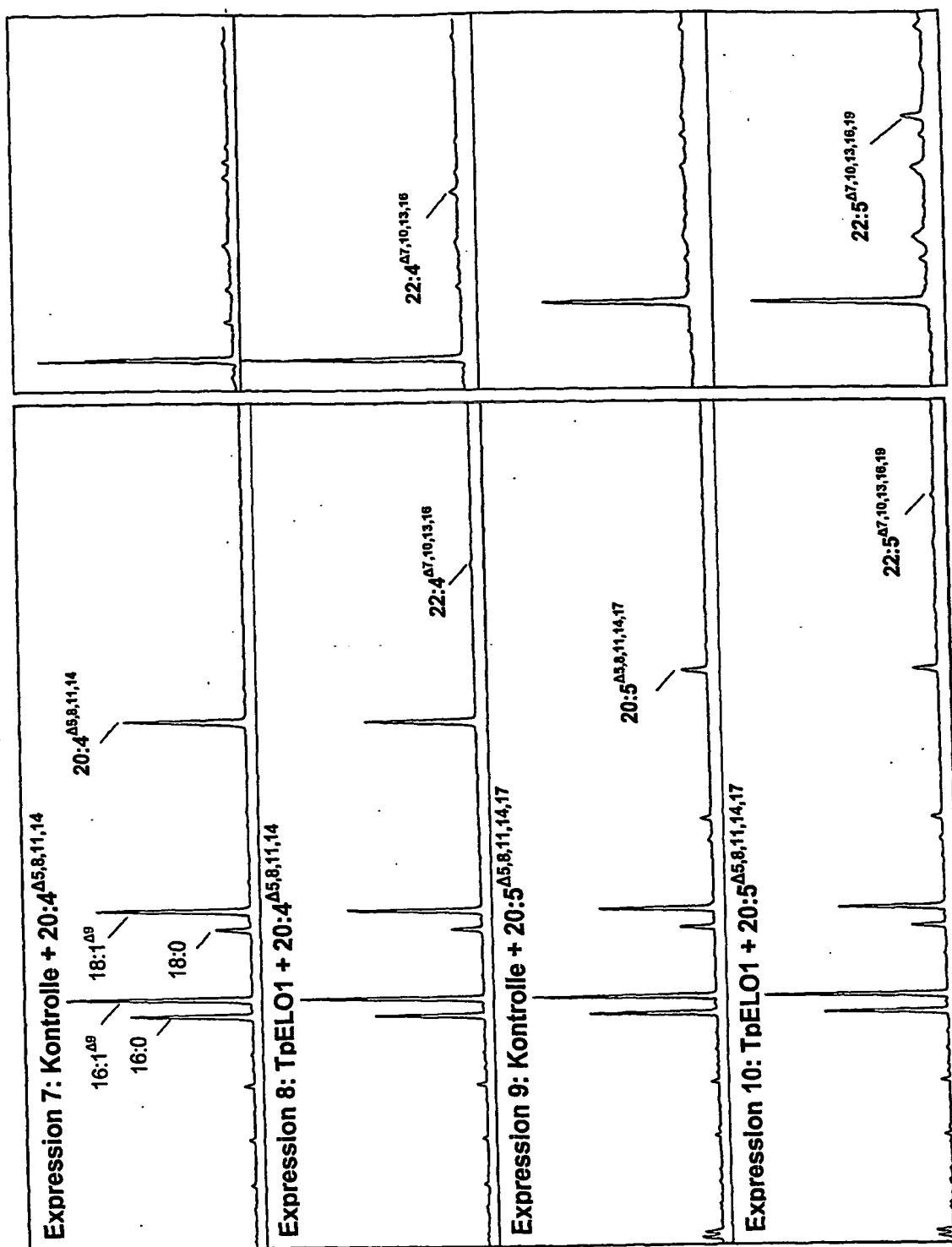




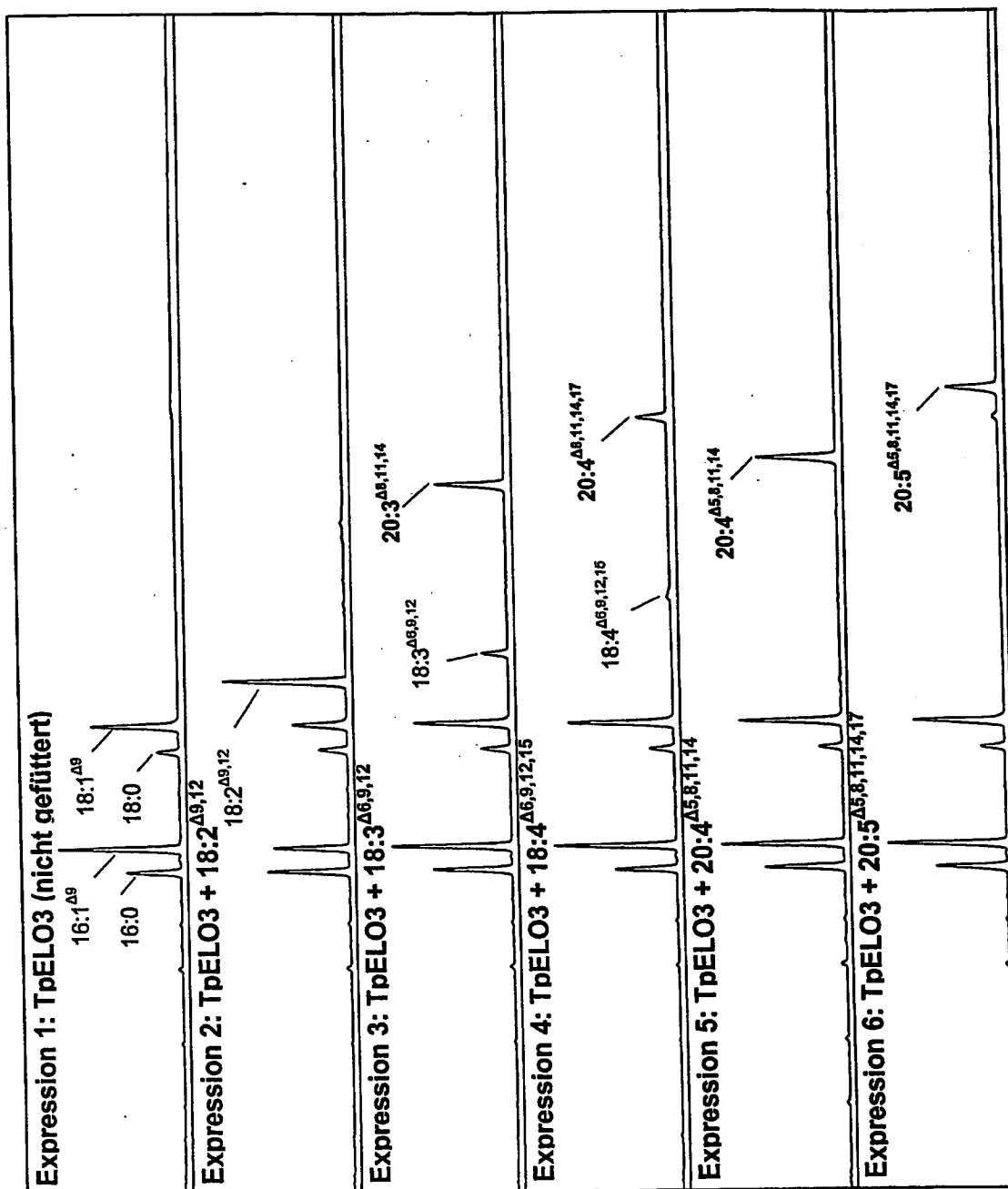
Figur 7: Elongation von Eicosapentaensäure durch OtElo1



Figur 9: Expression von TpELO1 in Hefe

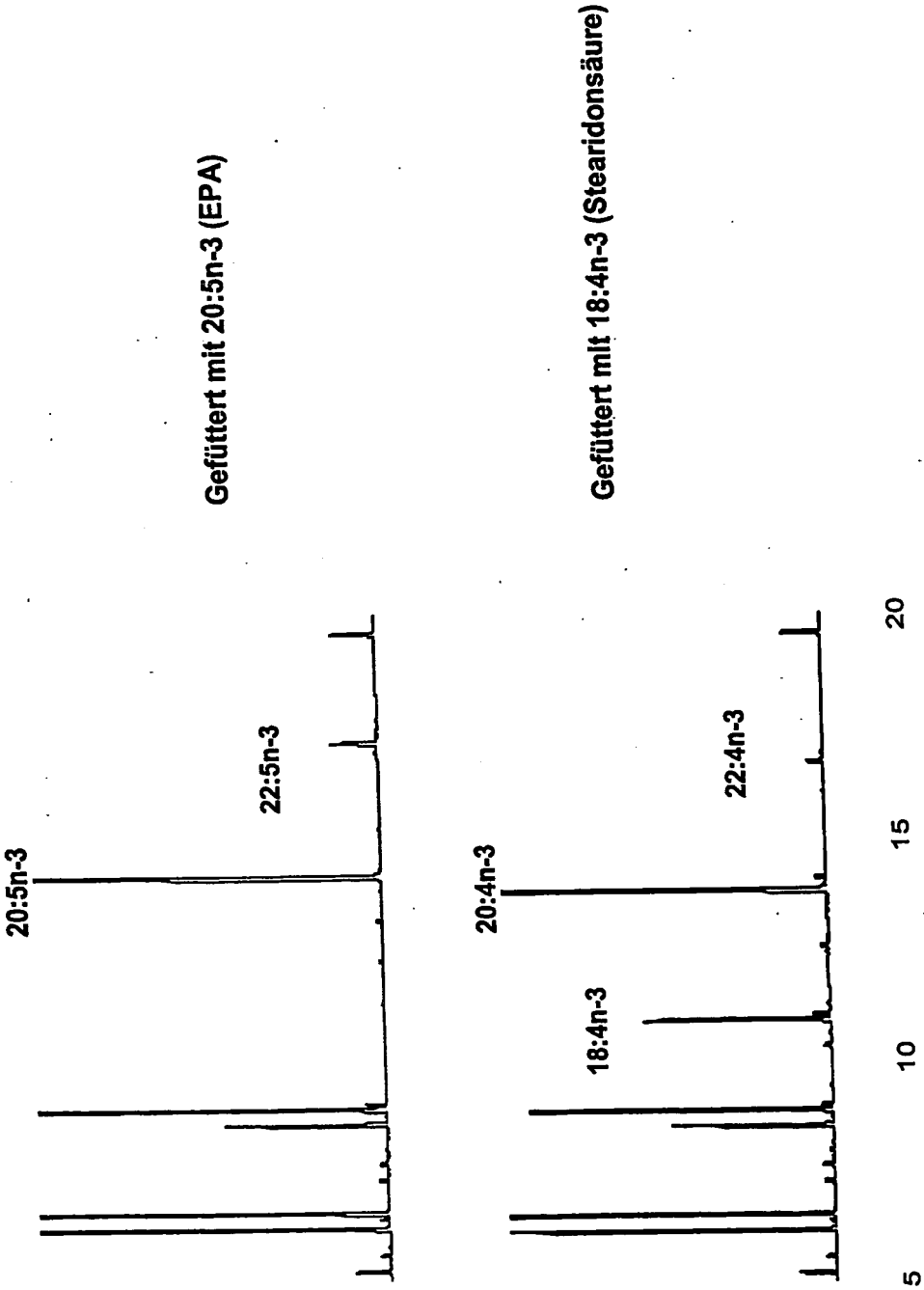


Figur 10: Expression von TpELO3 in Hefe.

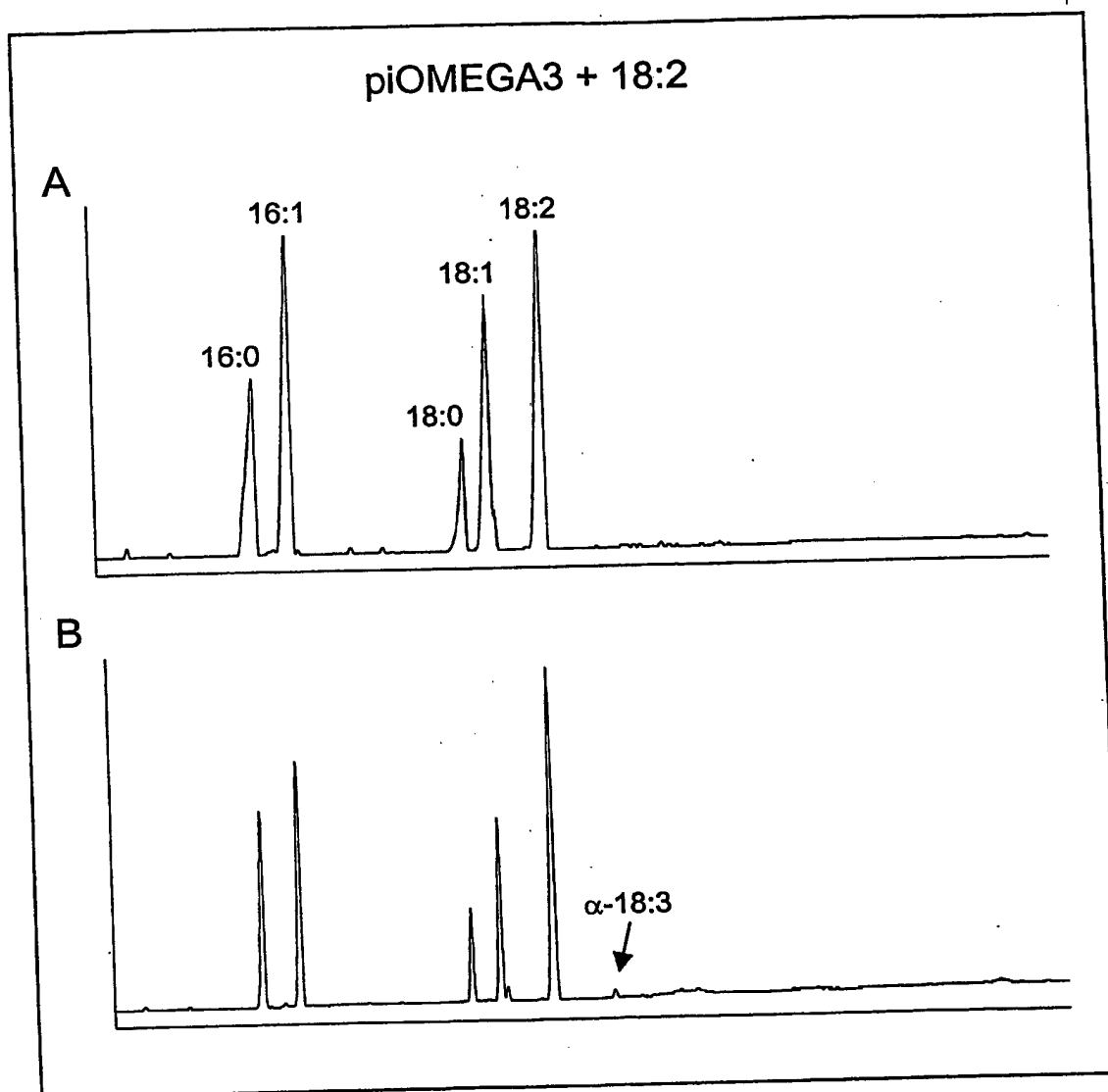




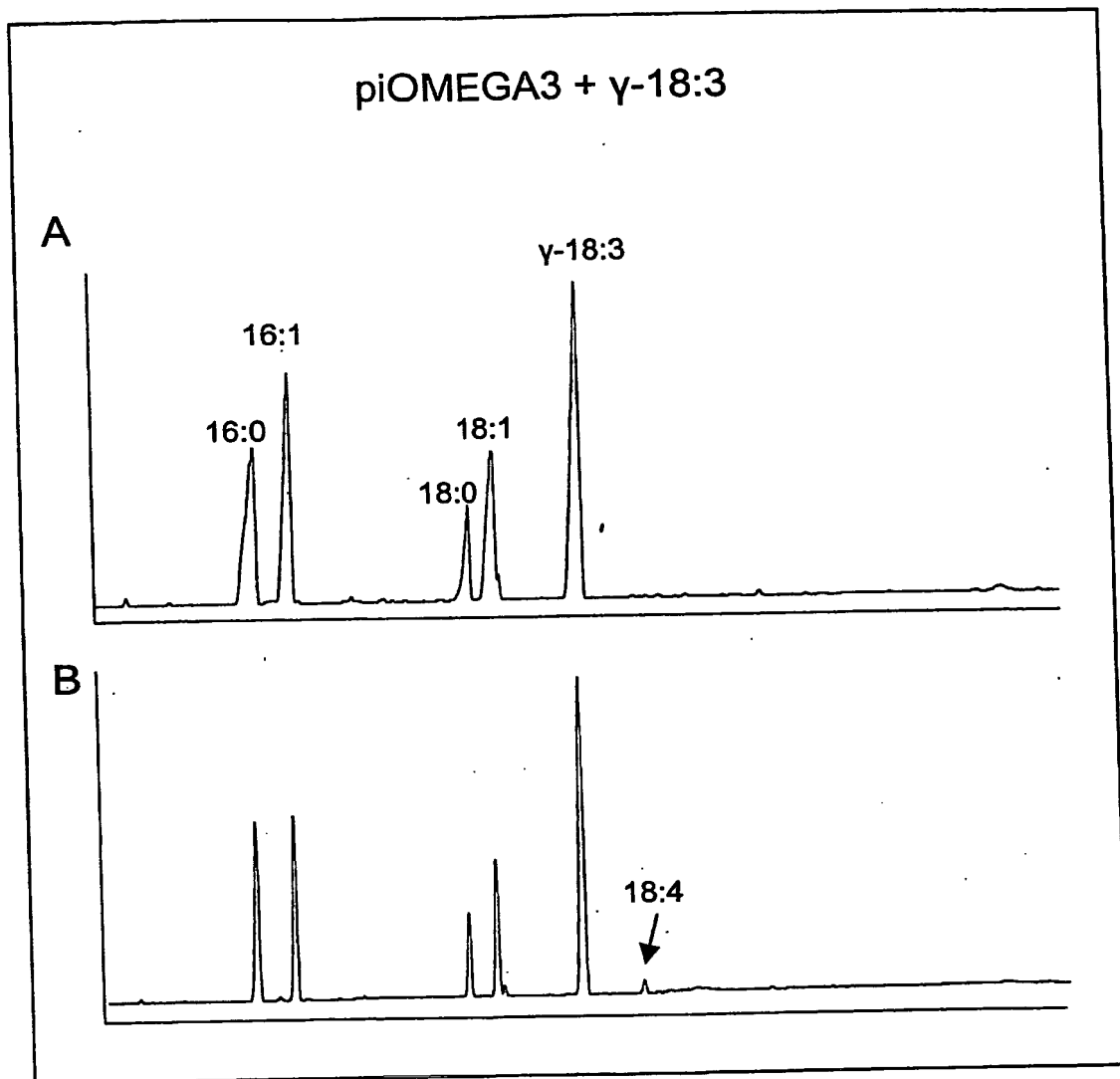
Figur 11: Expression von Thraustochytrium  $\Delta 5$ -Elongase TL16/pYES2.1 in Hefe.



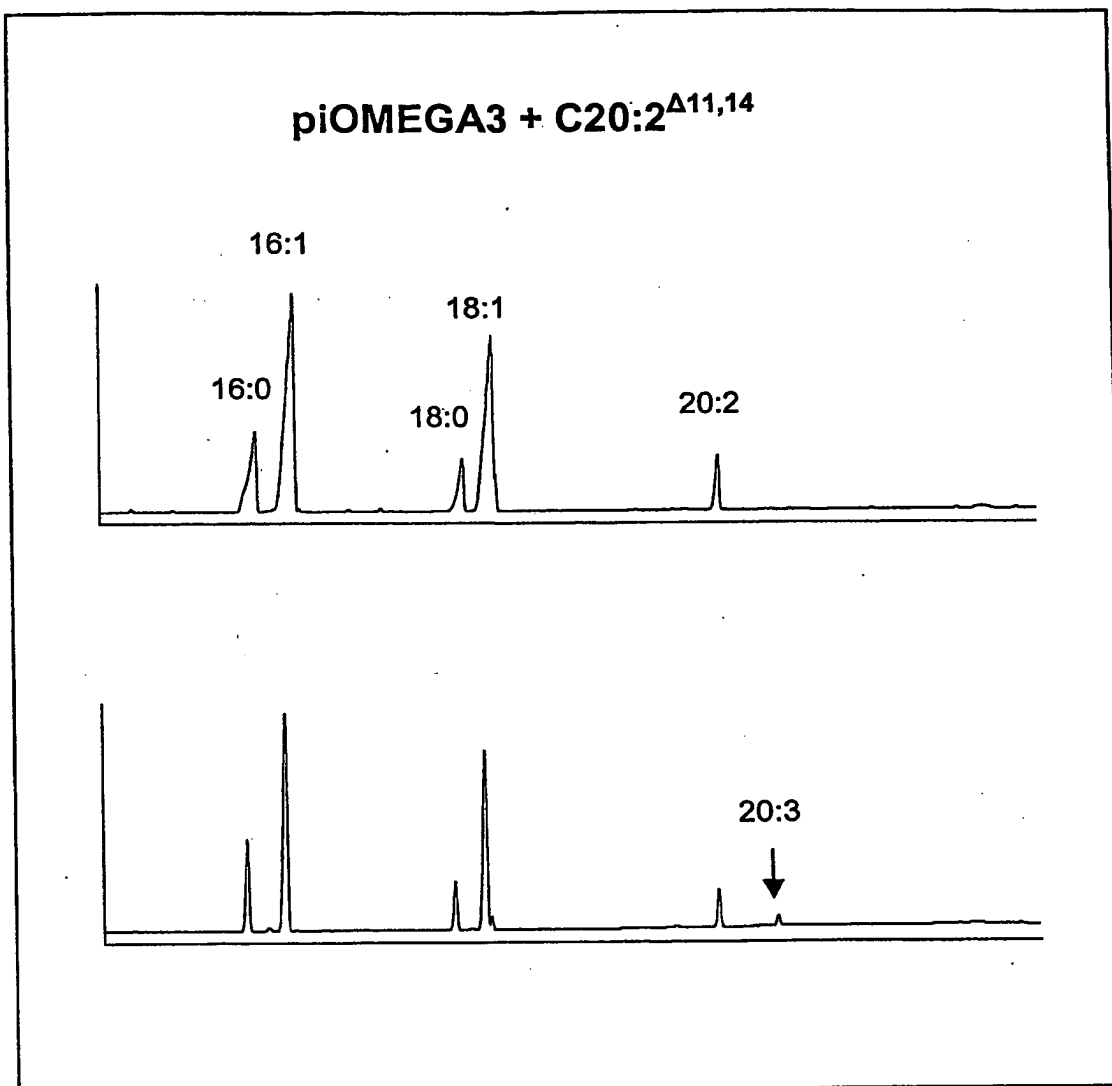
Figur 12: Desaturierung von Linolsäure (18:2  $\omega$ -6-Fettsäure) zu  $\alpha$ -Linolensäure (18:3  $\omega$ -3-Fettsäure) durch Pi-omega3Des.



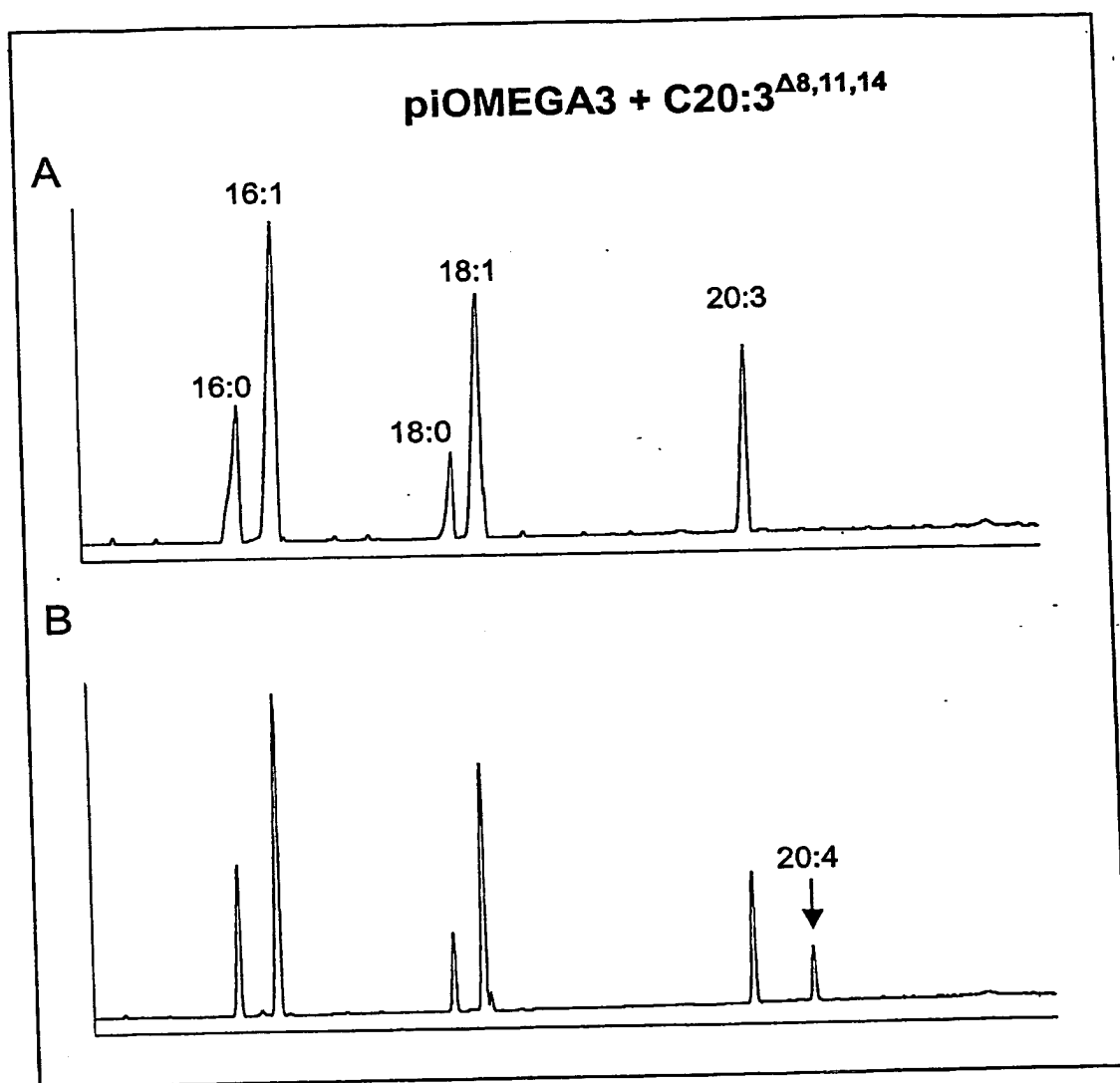
Figur 13: Desaturierung von  $\gamma$ -Linolensäure (18:3  $\omega$ -6-Fettsäure) zu Stearidonsäure (18:4  $\omega$ -3-Fettsäure) durch Pi-omega3Des.



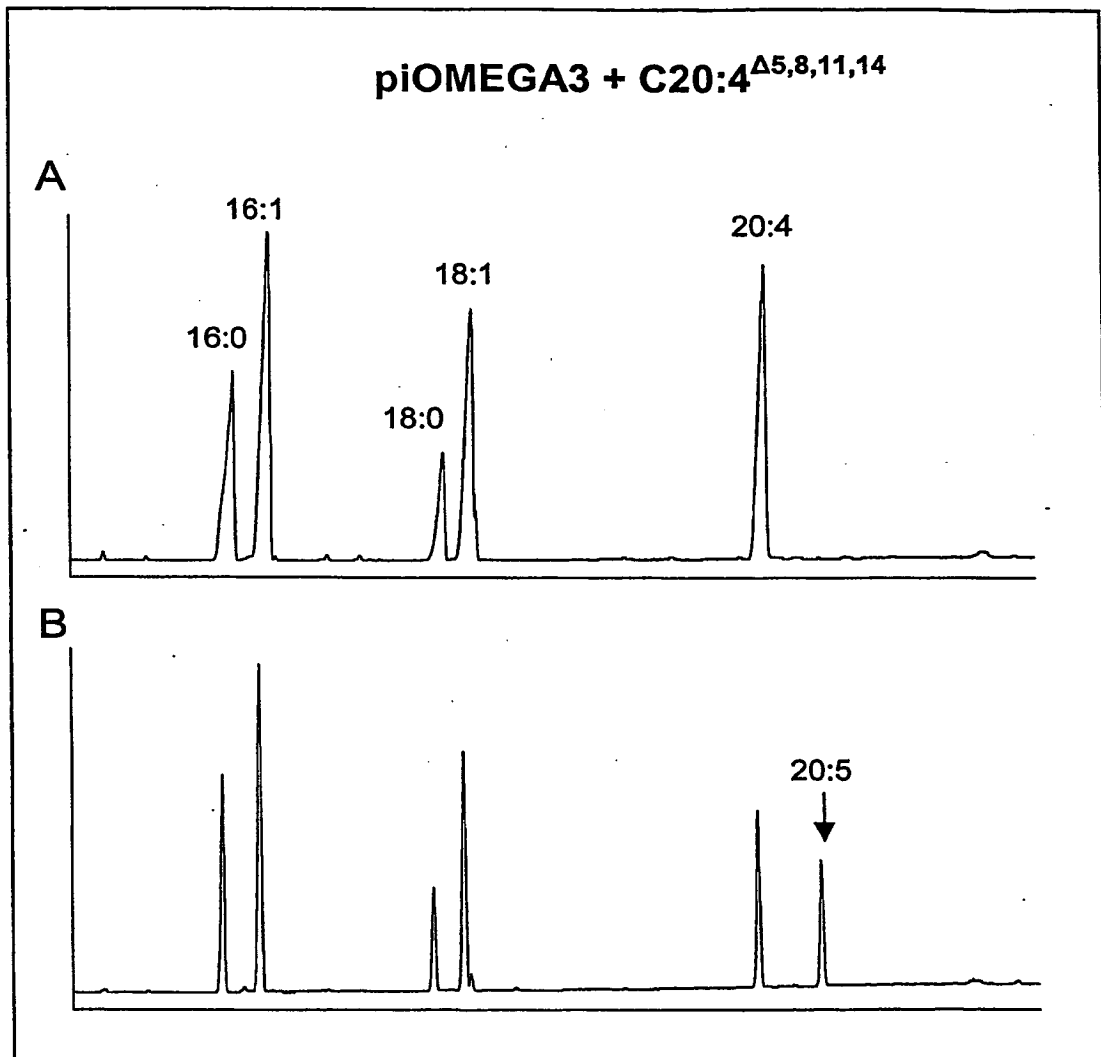
Figur 14: Desaturierung von C20:2  $\omega$ -6-Fettsäure zu C20:3  $\omega$ -3-Fettsäure durch Pi-omega3Des.



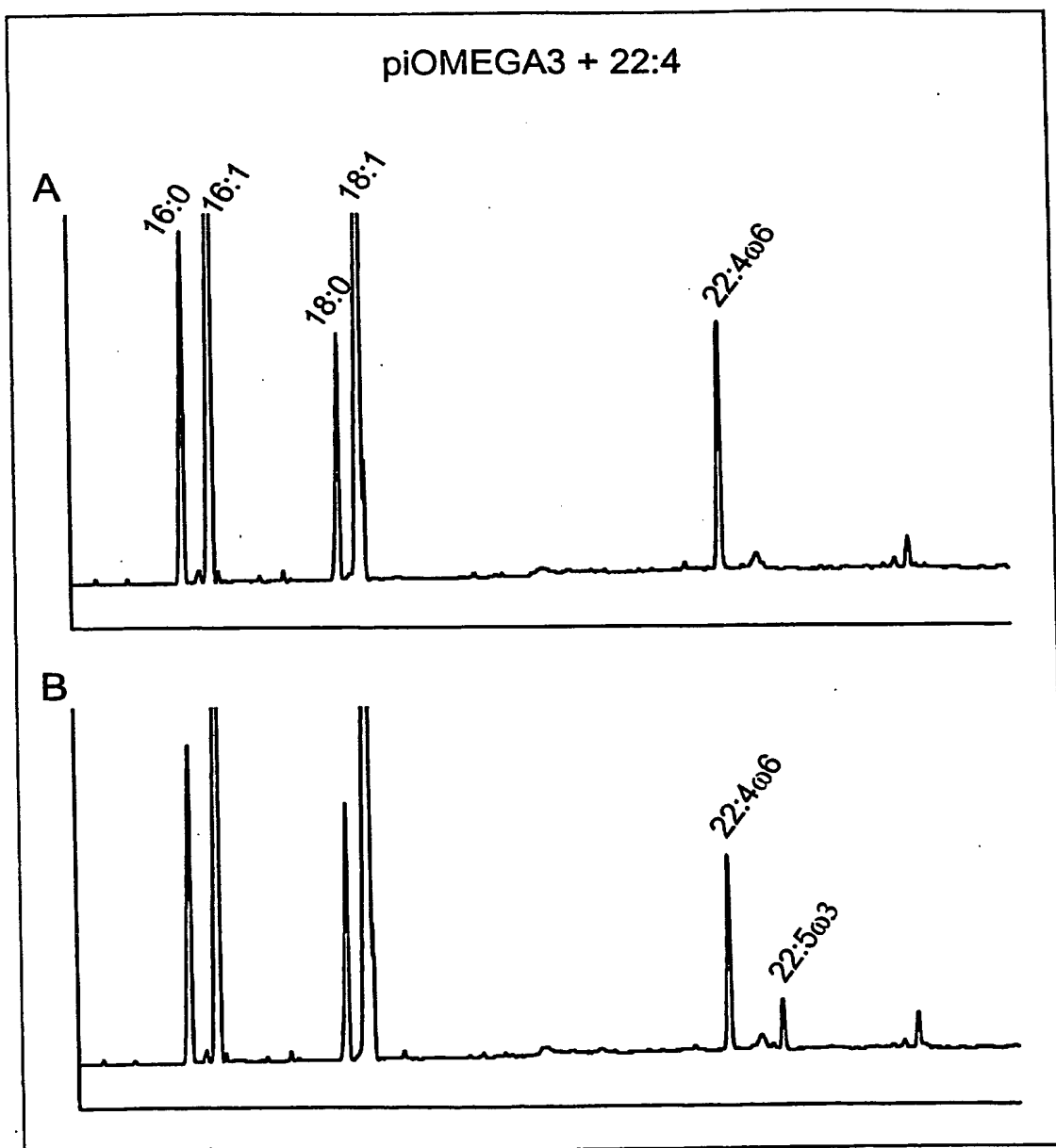
Figur 15: Desaturierung von C20:3- $\omega$ -6-Fettsäure zu C20:4- $\omega$ -3-Fettsäure durch Pi-omega3Des.



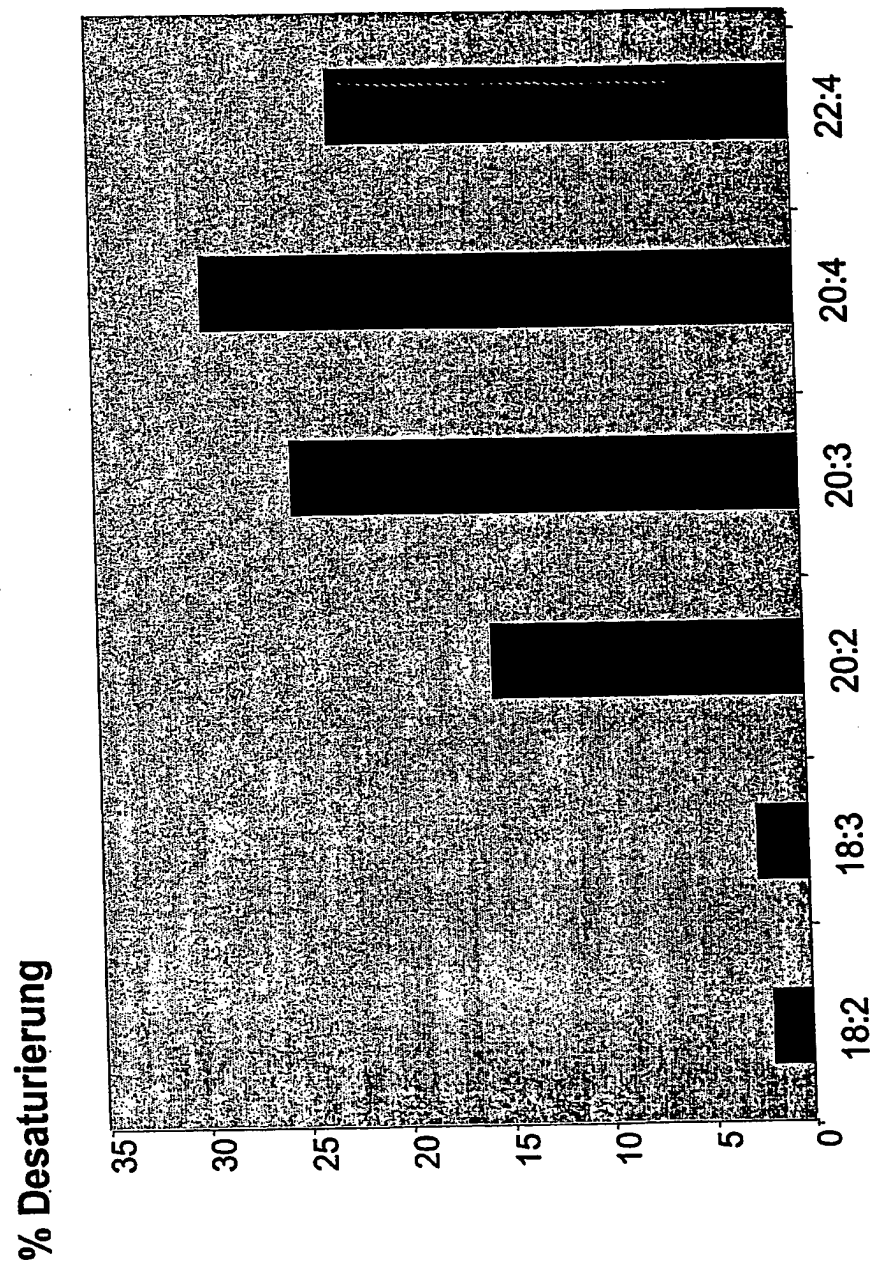
Figur 16: Desaturierung von Arachidonsäure (C20:4- $\omega$ -6-Fettsäure) zu Eicosapentaensäure (C20:5- $\omega$ -3-Fettsäure) durch die Pi-omega3Des.



Figur 17: Desaturierung von Docosatetraensäure (C22:4- $\omega$ -6-Fettsäure) zu Docosapentaensäure (C22:5- $\omega$ -3-Fettsäure) durch Pi-omega3Des.

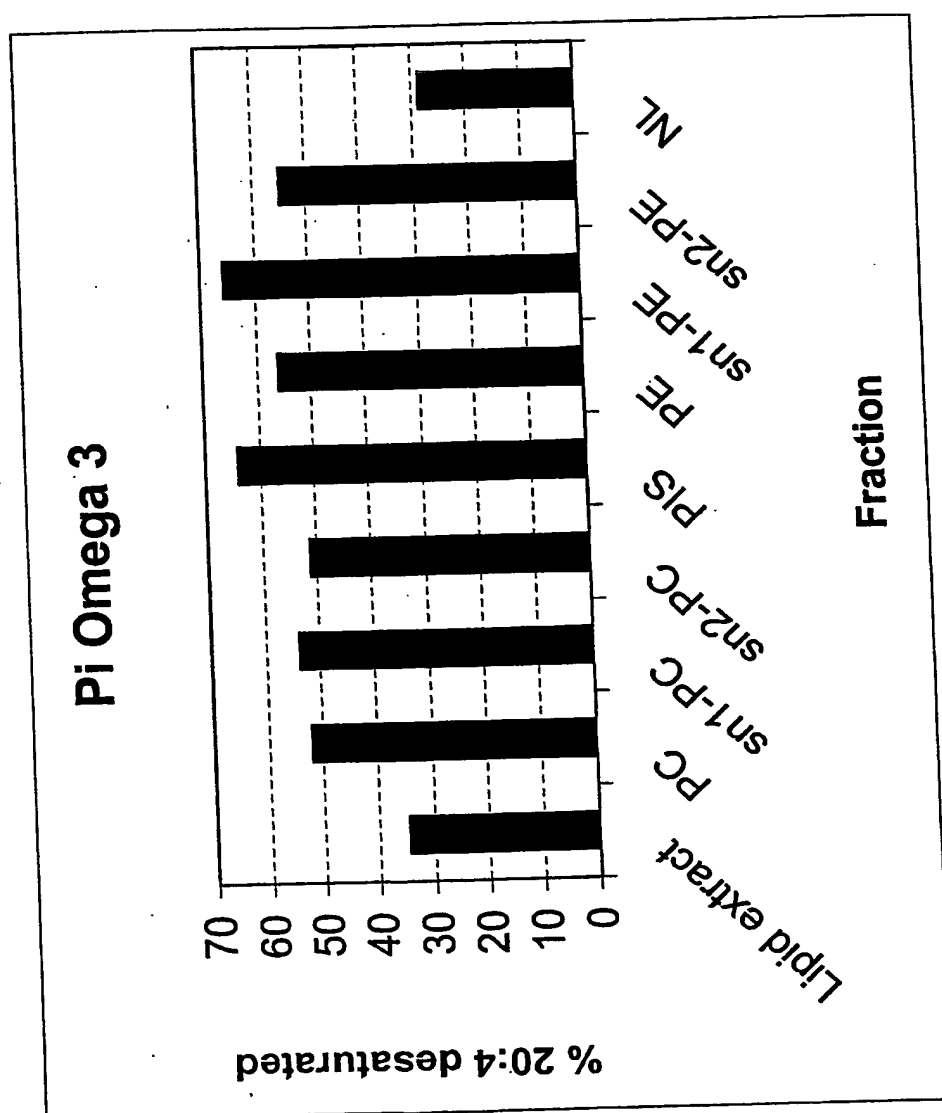


Figur 18: Substratspezifität der Pi-omega3Des gegenüber verschiedenen Fettsäuren



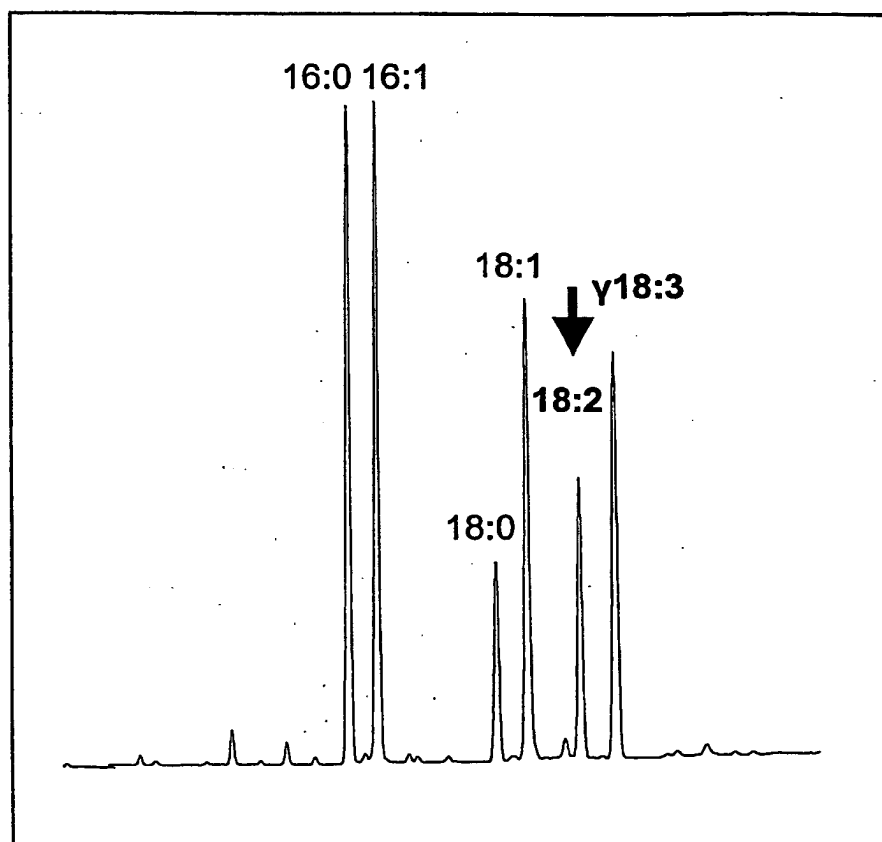


Figur 19: Desaturierung von Phospholipid gebundener Arachidonsäure zu EPA durch die Pi-Omega3Des



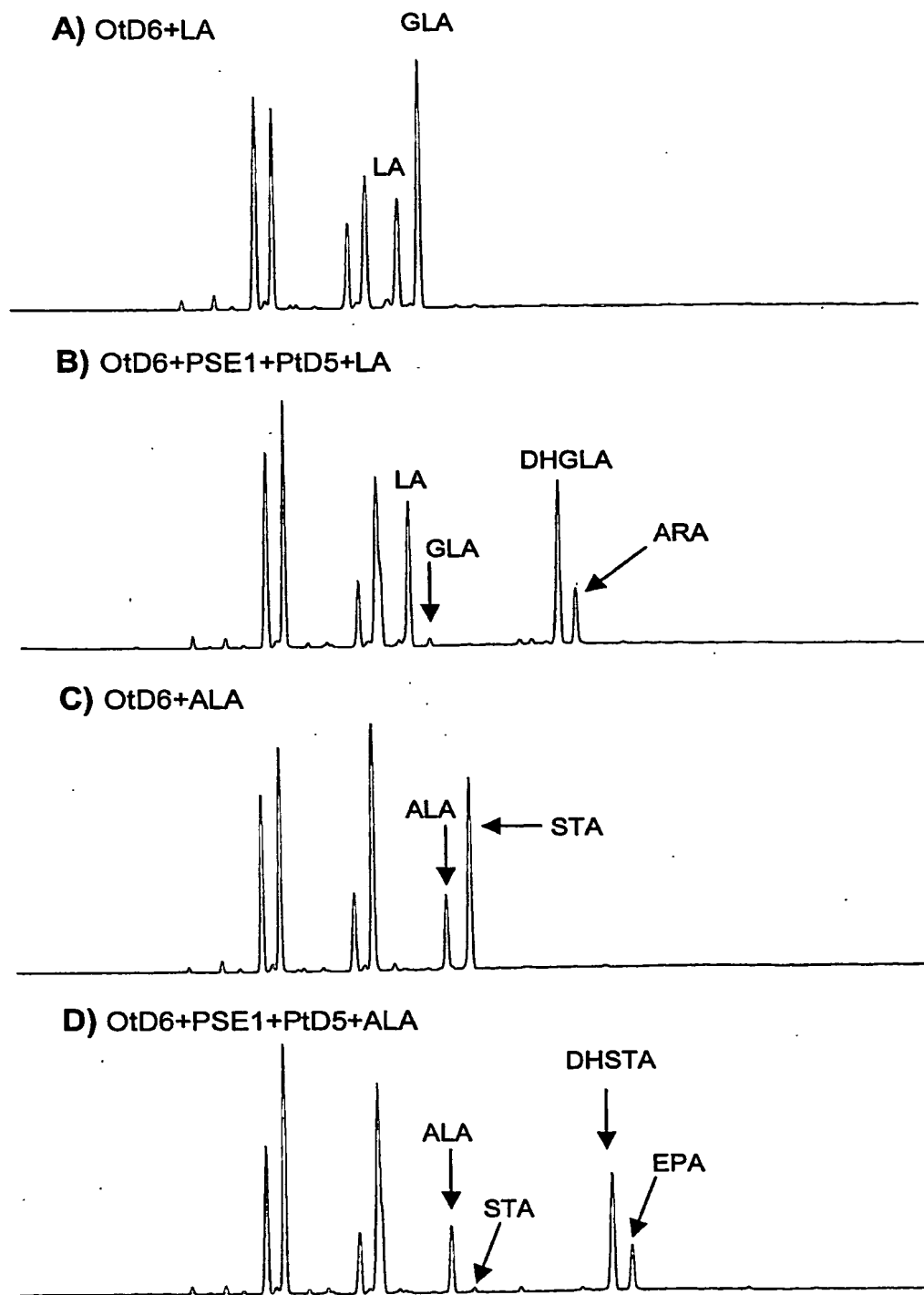
Figur 20: Umsetzung von Linolsäure (Pfeil) zu  $\gamma$ -Linolensäure ( $\gamma$ -18:3) durch Ot-Des6.1.

Absorption mAU



Retentionszeit

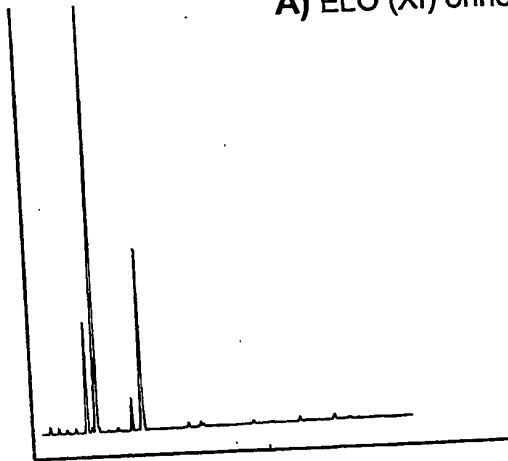
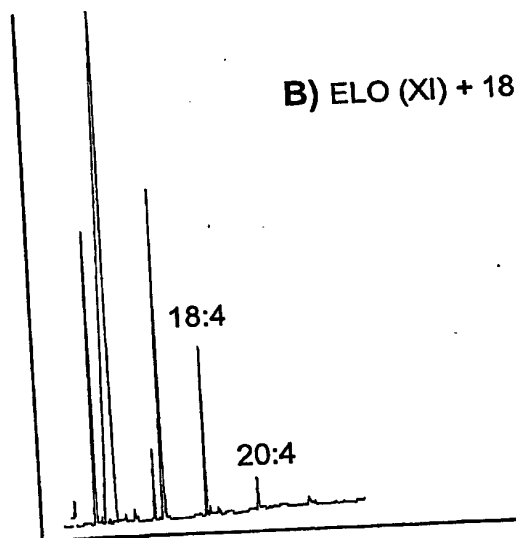
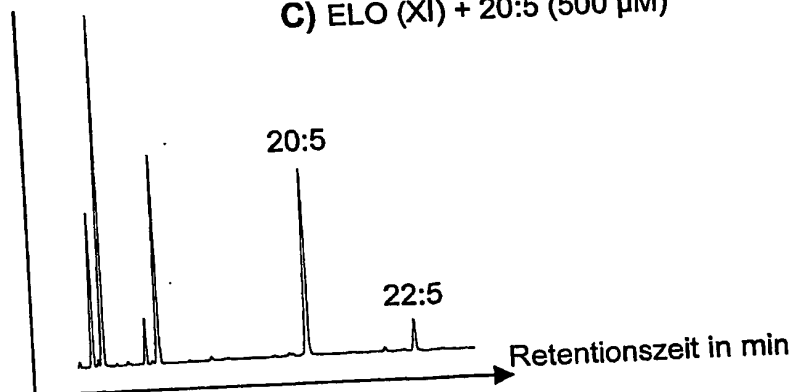
Figur 21: Umsetzung von Linolsäure und  $\alpha$ -Linolensäure (A und C), sowie Rekonstitution des ARA- bzw. EPA-Syntheseweges in Hefe (B und D) in Gegenwart von OtD6.1.



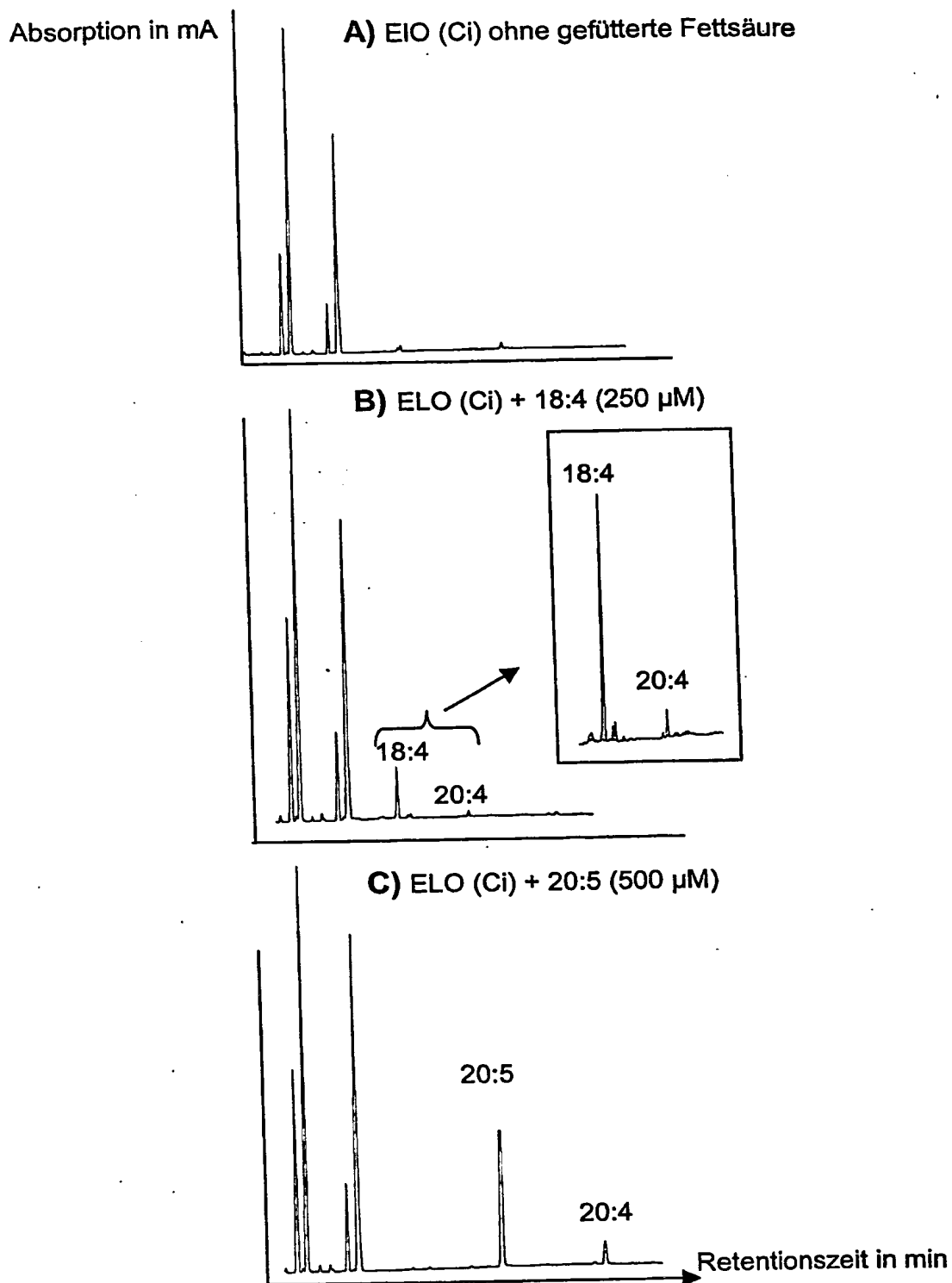
Figur 22: Expression von ELO(XI) in Hefe.

Absorption in mA

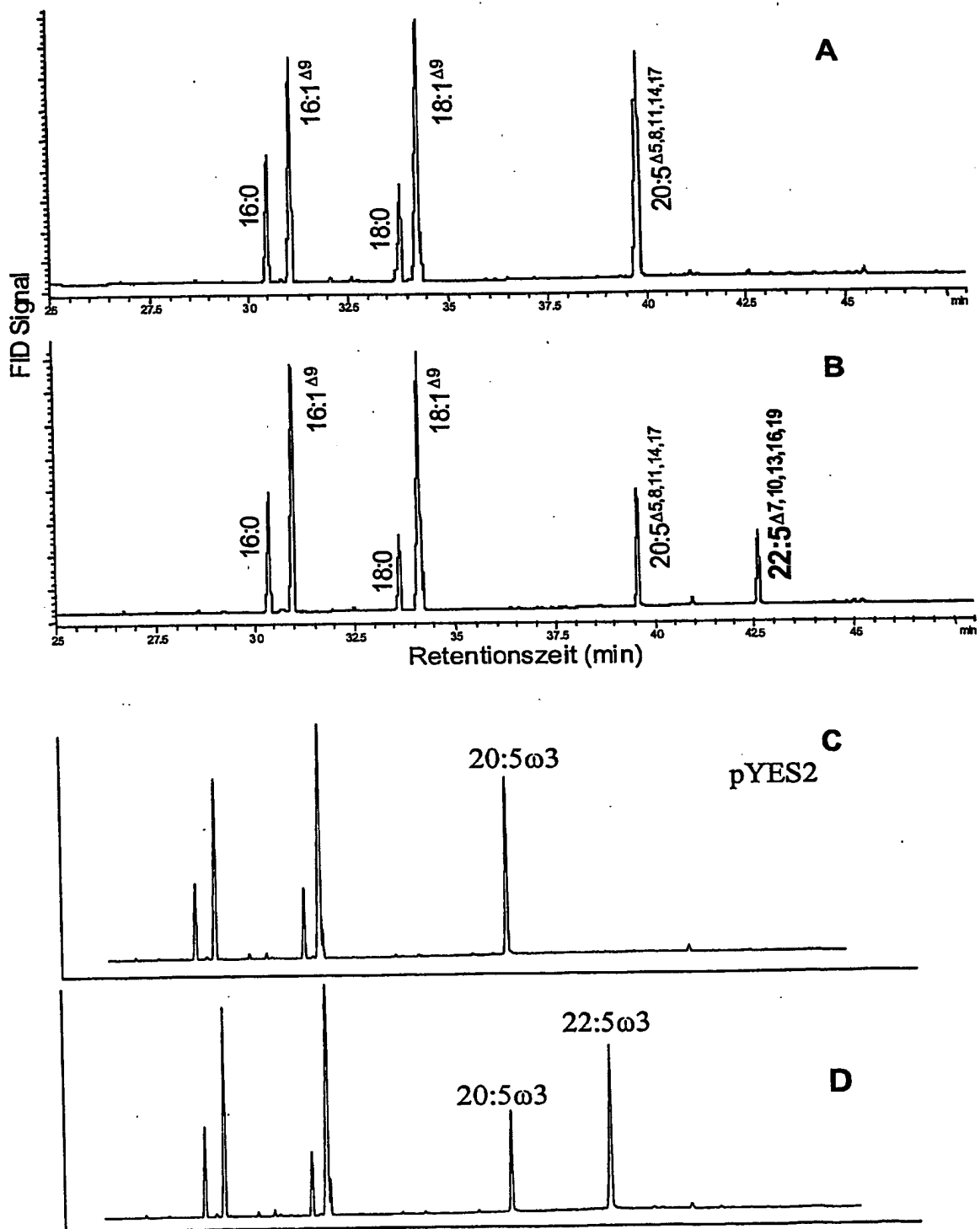
A) ELO (XI) ohne gefütterte Fettsäure

B) ELO (XI) + 18:4 $\Delta$ 6,9,12,15 (250  $\mu$ M)C) ELO (XI) + 20:5 (500  $\mu$ M)

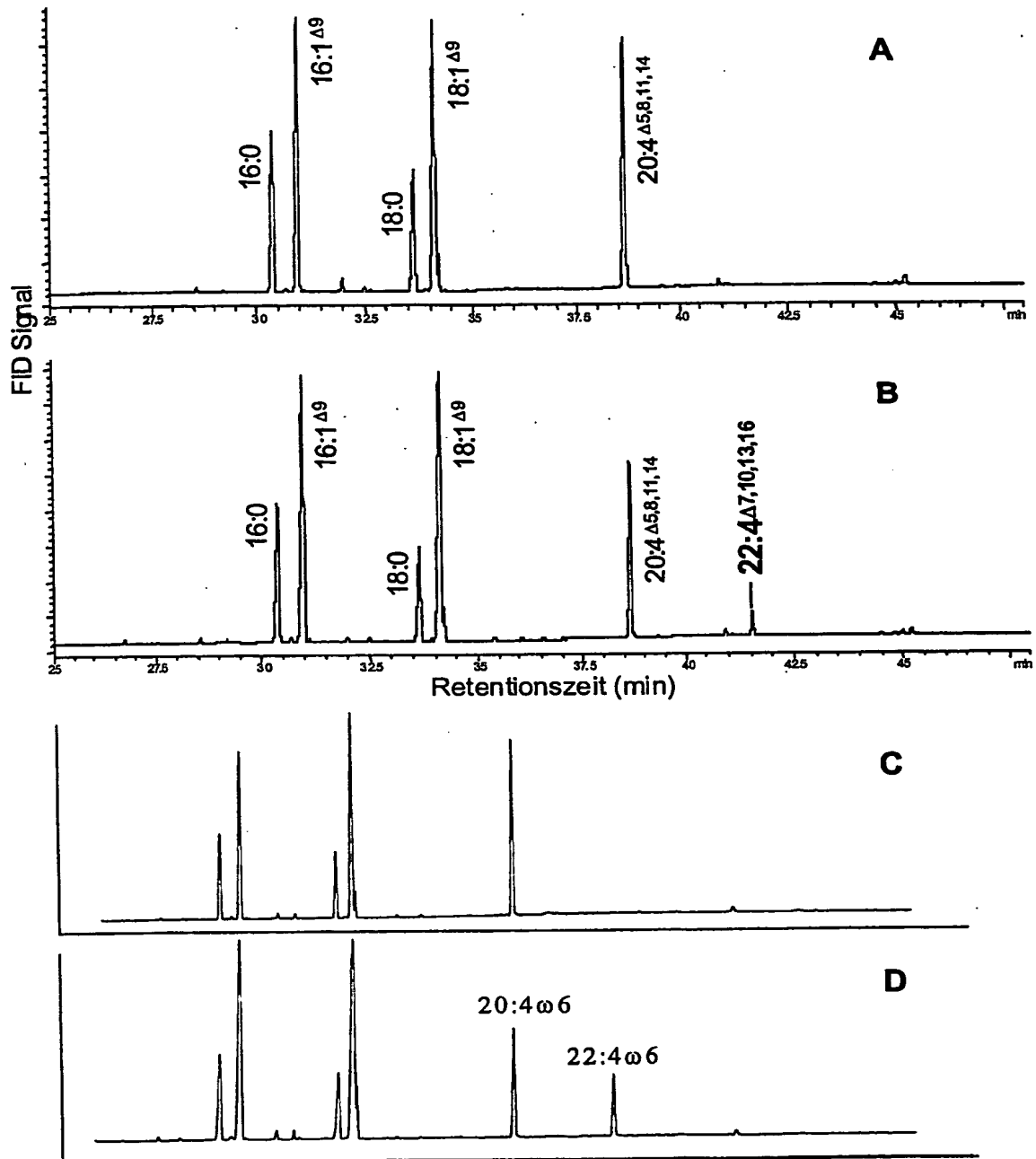
Figur 23:



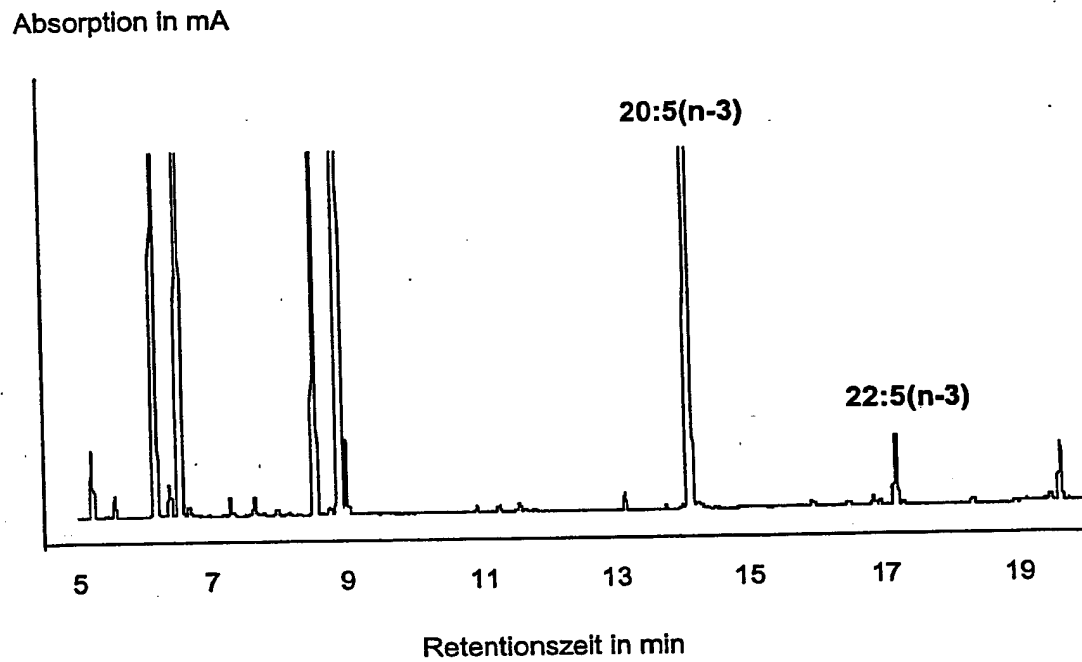
Figur 24: Elongation von Eicosapentaensäure durch OtElo1 (B) bzw. OtElo1.2 (D).  
Die Kontrollen (A, C) zeigen nicht das Produkt der Elongation (22:5 $\omega$ 3).



Figur 25: Elongation von Arachidonsäure durch OtElo1 (B) bzw. OtElo1.2 (D). Die Kontrollen (A, C) zeigen nicht das Produkt der Elongation (22:4 $\omega$ 6).



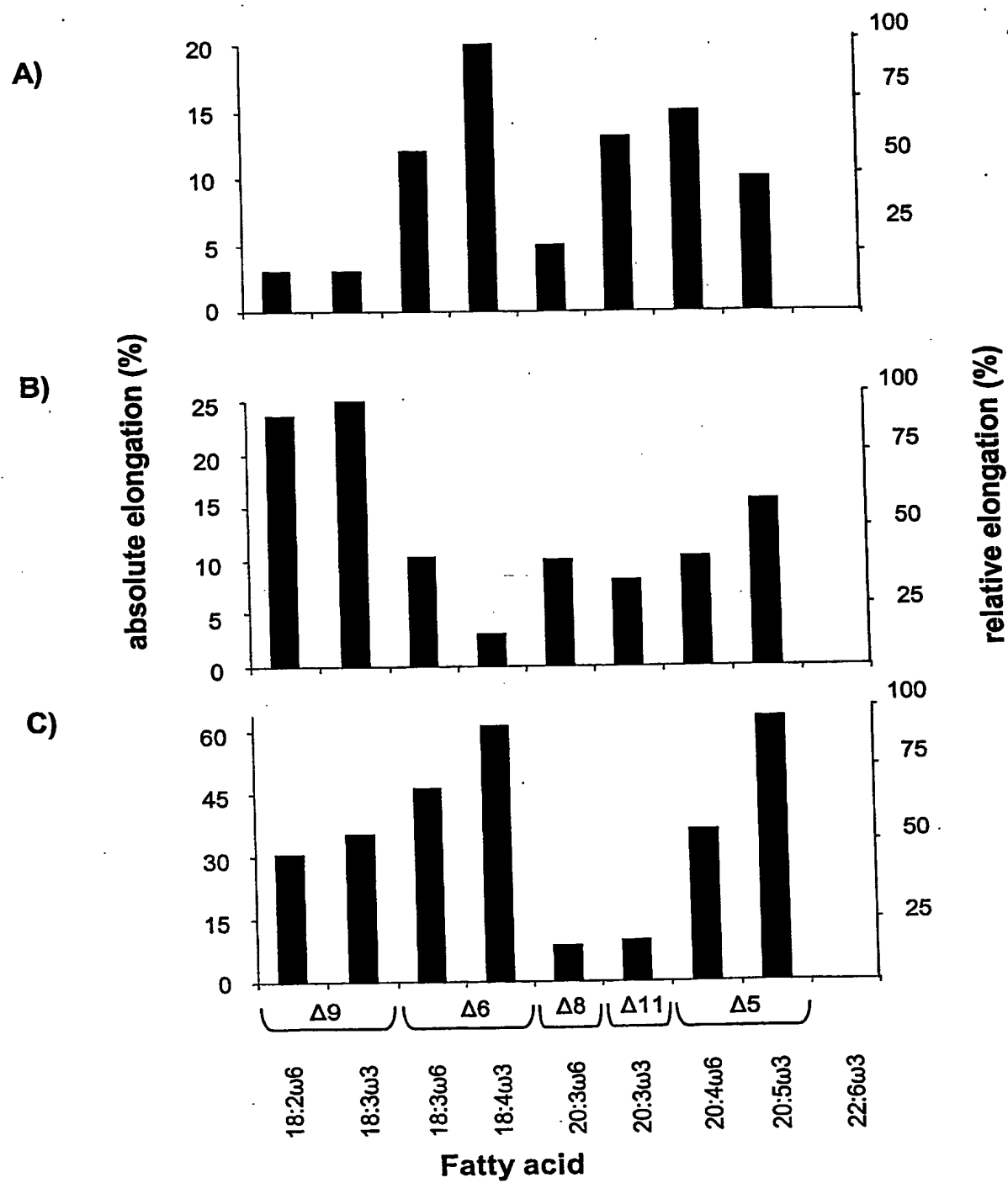
Figur 26: Elongation von 20:5n-3 durch die Elongasen At3g06470.



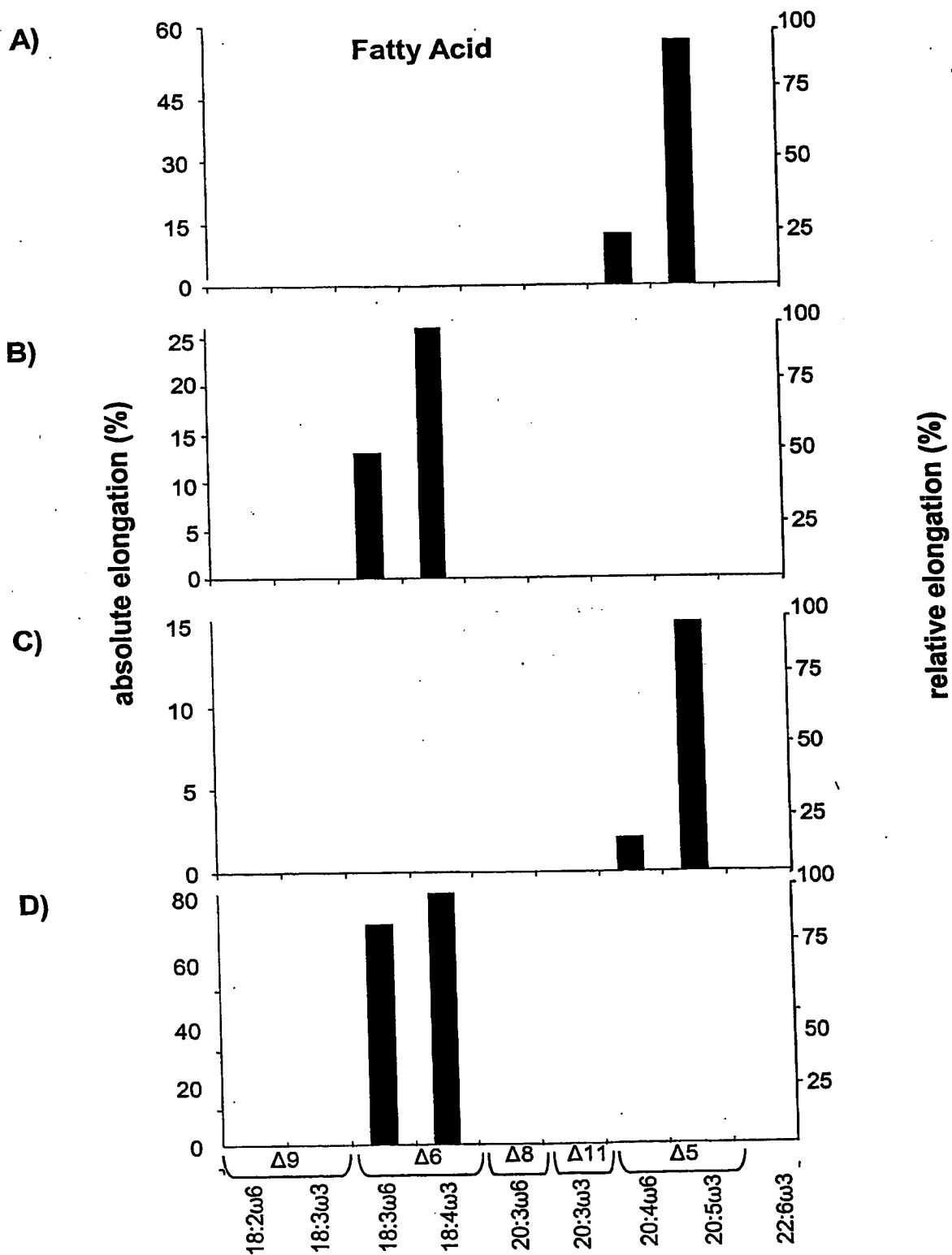


27/33

Figur 27: Substratspezifität der *Xenopus* Elongase (A), *Ciona* Elongase (B) und *Onchornynchus* Elongase (C)

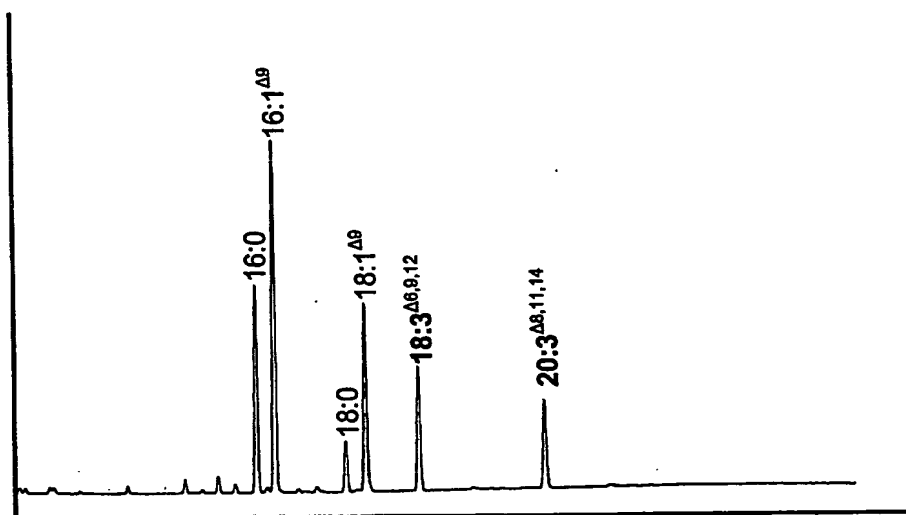


Figur 28: Substratspezifität der *Ostreococcus*  $\Delta$ -5-Elongase (A), der *Ostreococcus*  $\Delta$ -6-Elongase (B), der *Thalassiosira*  $\Delta$ -5-Elongase (C) und *Thalassiosira* *Ostreococcus*  $\Delta$ -6-Elongase (D)

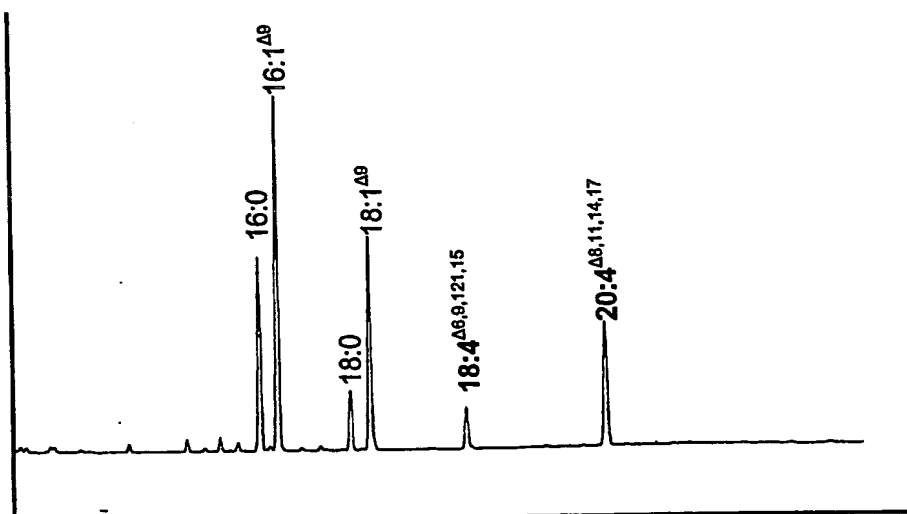


Figur 29: Expression der *Phaeodactylum tricornutum*  $\Delta$ -6-Elongase (PtELO6) in Hefe. A) zeigt die Elongation der C18:3 $^{\Delta 8,9,12}$  Fettsäure und B) die Elongation der C18:4 $^{\Delta 8,9,12,15}$  Fettsäure

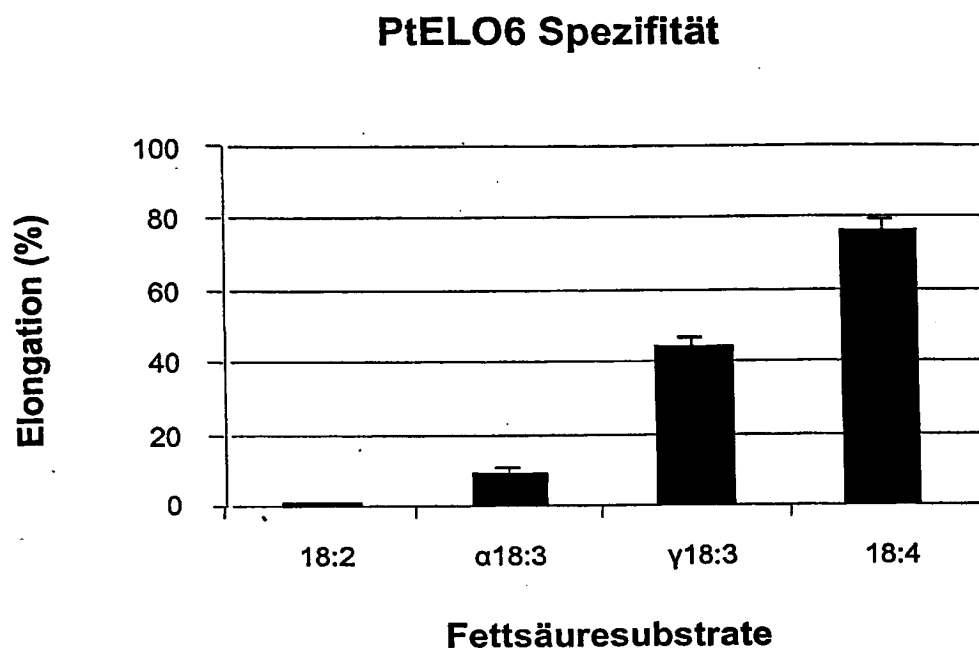
A)



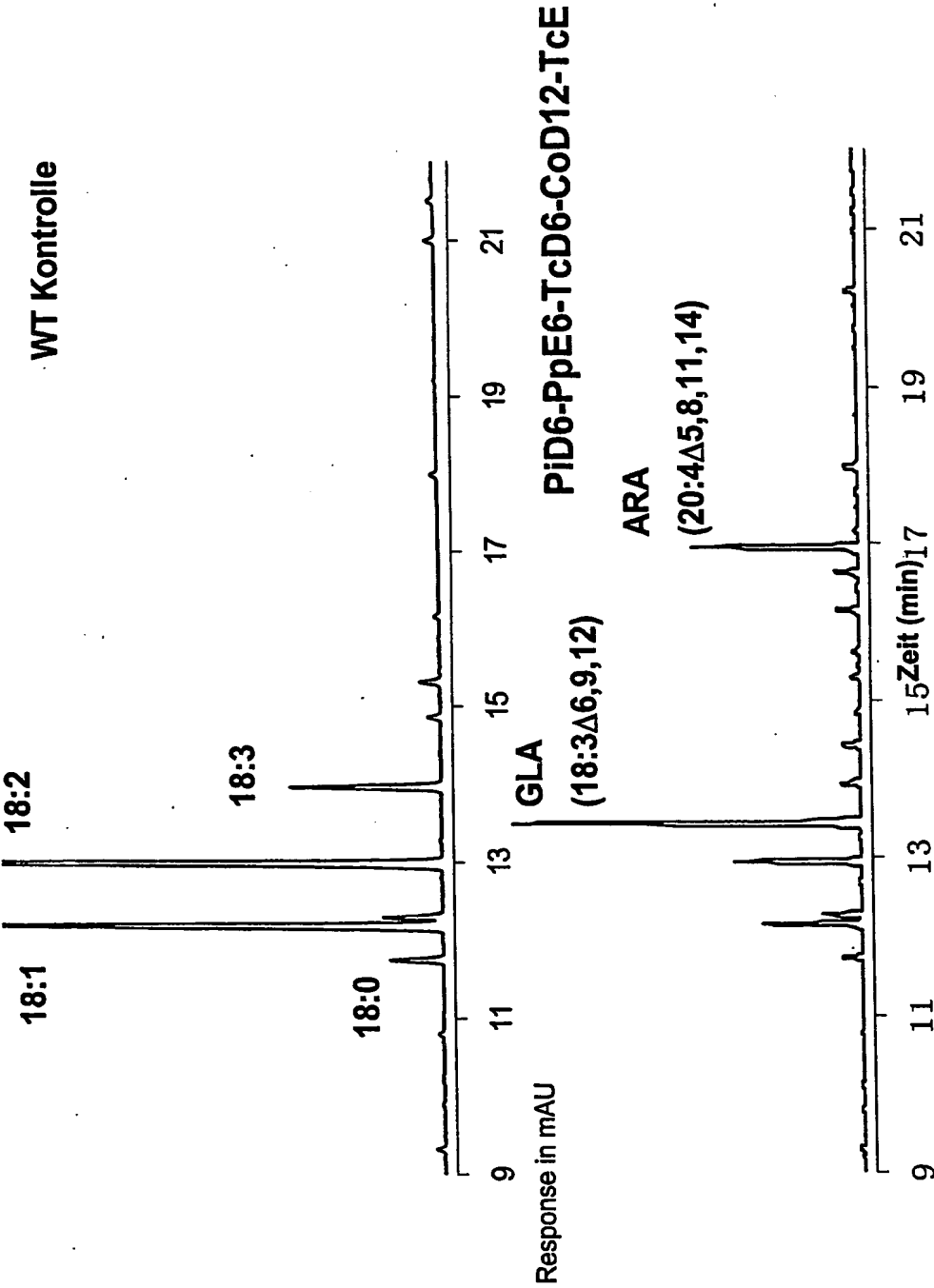
B)



Figur 30: Figur 30 zeigt die Substratspezifität von PtELO6 in Bezug auf die gefütterten Substrate.

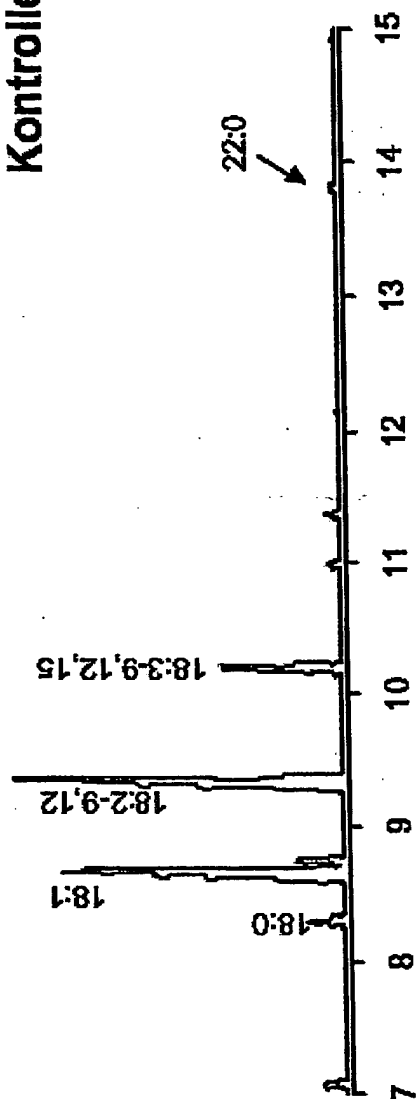


Figur 31: Gaschromatographische Analyse des Samens einer transgenen Pflanze, transformiert mit pSUN-5G.

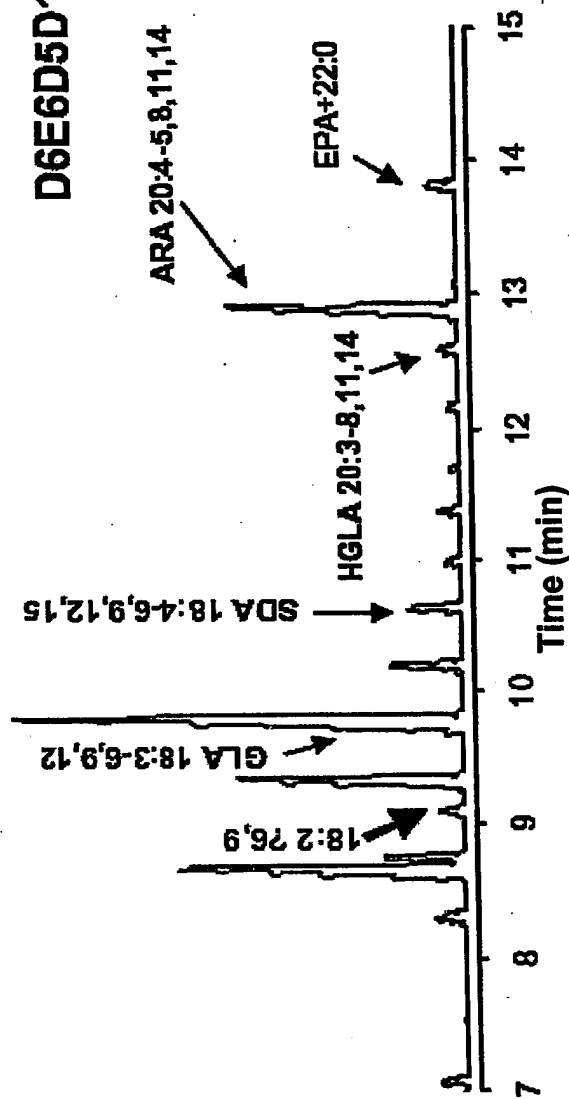


Figur 32: Gaschromatographische Analyse des Samens einer transgenen Pflanze, transformiert mit pGPTV-D6Des(Pir)\_D5Des(Tc)\_D6Elo(PP)\_12Des(Co).

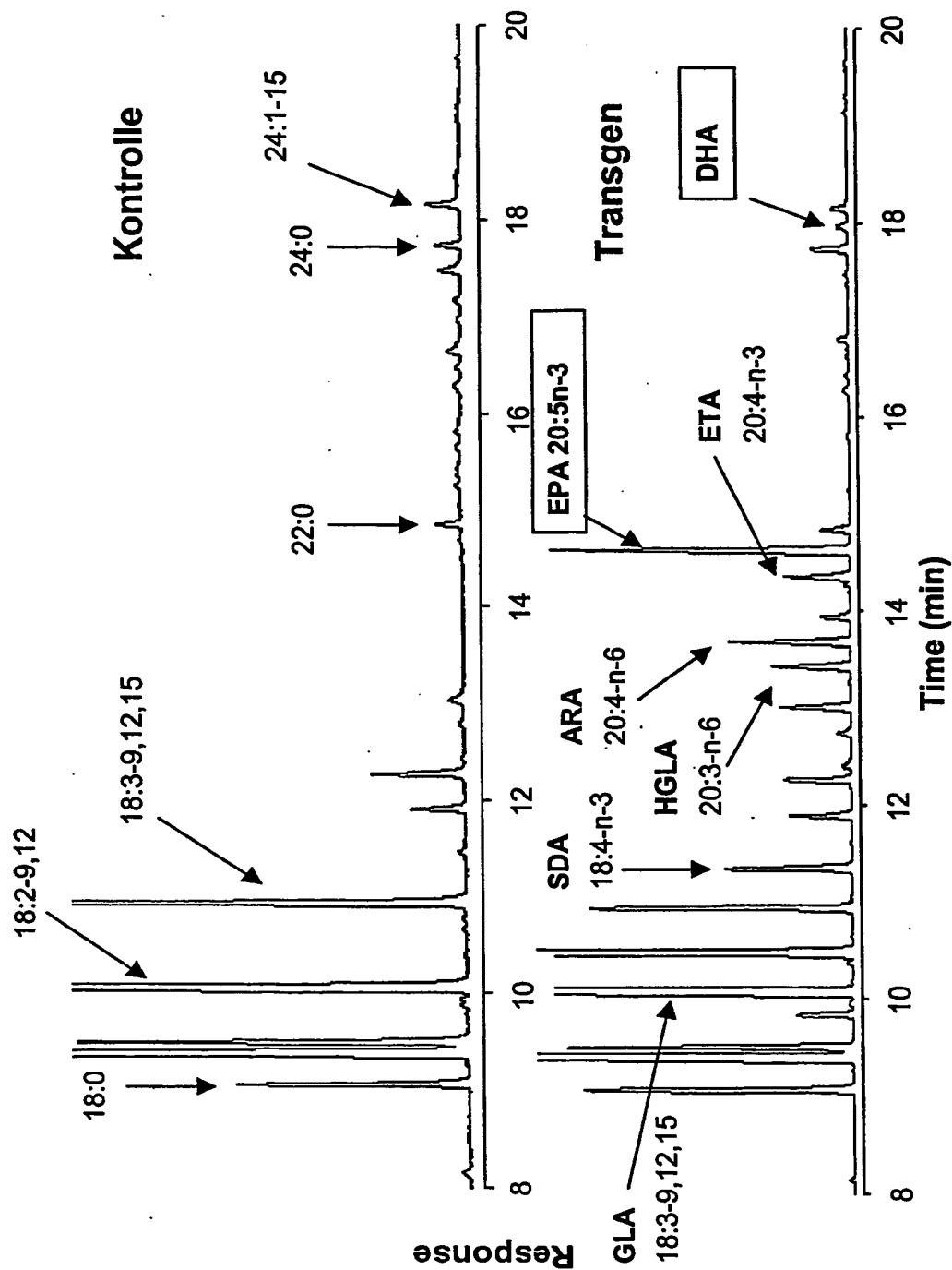
# Kontrolle



# D6E6D5D12



Figur 33: DHA in transgenen Samen von *Brassica juncea*. Die Pflanzen wurden mit dem Konstrukt pSUN-8G transformiert.



## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; BASF Plant Science GmbH

&lt;120&gt; Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren in transgenen Pflanzen

&lt;130&gt; PF56186

&lt;140&gt; 20041035

&lt;141&gt; 2004-12-22

&lt;160&gt; 202

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1266

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Euglena gracilis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1266)

&lt;223&gt; Delta-8-Desaturase

&lt;400&gt; 1

atg aag tca aag cgc caa gcg ctt ccc ctt aca att gat gga aca aca	48
Met Lys Ser Lys Arg Gln Ala Leu Pro Leu Thr Ile Asp Gly Thr Thr	
1 5 10 15	
tat gat gtg tct gcc tgg gtc aat ttc cac cct ggt ggt gcg gaa att	96
Tyr Asp Val Ser Ala Trp Val Asn Phe His Pro Gly Gly Ala Glu Ile	
20 25 30	
ata gag aat tac caa gga agg gat gcc act gat gcc ttc atg gtt atg	144
Ile Glu Asn Tyr Gln Gly Arg Asp Ala Thr Asp Ala Phe Met Val Met	
35 40 45	
cac tct caa gaa gcc ttc gac aag ctc aag cgc atg ccc aaa atc aat	192
His Ser Gln Glu Ala Phe Asp Lys Leu Lys Arg Met Pro Lys Ile Asn	
50 55 60	
ccc agt tct gag ttg cca ccc cag gct gca gtg aat gaa gct caa gag	240
Pro Ser Ser Glu Leu Pro Pro Gln Ala Ala Val Asn Glu Ala Gln Glu	
65 70 75 80	
gat ttc cgg aag ctc cga gaa gag ttg atc gca act ggc atg ttt gat	288
Asp Phe Arg Lys Leu Arg Glu Glu Leu Ile Ala Thr Gly Met Phe Asp	
85 90 95	
gcc tcc ccc ctc tgg tac tca tac aaa atc agc acc aca ctg ggc ctt	336
Ala Ser Pro Leu Trp Tyr Ser Tyr Lys Ile Ser Thr Thr Leu Gly Leu	



## 2

100	105	110	
gga gtg ctg ggt tat ttc ctg atg gtt cag tat cag atg tat ttc att			384
Gly Val Leu Gly Tyr Phe Leu Met Val Gln Tyr Gln Met Tyr Phe Ile			
115	120	125	
ggg gca gtg ttg ctt ggg atg cac tat caa cag atg ggc tgg ctt tct			432
Gly Ala Val Leu Leu Gly Met His Tyr Gln Gln Met Gly Trp Leu Ser			
130	135	140	
cat gac att tgc cac cac cag act ttc aag aac cgg aac tgg aac aac			480
His Asp Ile Cys His His Gln Thr Phe Lys Asn Arg Asn Trp Asn Asn			
145	150	155	160
ctc gtg gga ctg gta ttt ggc aat ggt ctg caa ggt ttt tcc gtg aca			528
Leu Val Gly Leu Val Phe Gly Asn Gly Leu Gln Gly Phe Ser Val Thr			
165	170	175	
tgc tgg aag gac aga cac aat gca cat cat tcg gca acc aat gtt caa			576
Cys Trp Lys Asp Arg His Asn Ala His His Ser Ala Thr Asn Val Gln			
180	185	190	
ggg cac gac cct gat att gac aac ctc ccc ctc tta gcc tgg tct gag			624
Gly His Asp Pro Asp Ile Asp Asn Leu Pro Leu Leu Ala Trp Ser Glu			
195	200	205	
gat gac gtc aca cgg gcg tca ccg att tcc cgc aag ctc att cag ttc			672
Asp Asp Val Thr Arg Ala Ser Pro Ile Ser Arg Lys Leu Ile Gln Phe			
210	215	220	
cag cag tat tat ttc ttg gtc atc tgt atc ttg ttg cgg ttc att tgg			720
Gln Gln Tyr Tyr Phe Leu Val Ile Cys Ile Leu Leu Arg Phe Ile Trp			
225	230	235	240
tgt ttc cag agc gtg ttg acc gtg cgc agt ctg aag gac aga gat aac			768
Cys Phe Gln Ser Val Leu Thr Val Arg Ser Leu Lys Asp Arg Asp Asn			
245	250	255	
caa ttc tat cgc tct cag tat aag aag gag gcc att ggc ctc gcc ctg			816
Gln Phe Tyr Arg Ser Gln Tyr Lys Lys Glu Ala Ile Gly Leu Ala Leu			
260	265	270	
cat tgg aca ttg aag gcc ctg ttc cac tta ttc ttt atg ccc agc atc			864
His Trp Thr Leu Lys Ala Leu Phe His Leu Phe Phe Met Pro Ser Ile			
275	280	285	
ctc aca tcg ctg ttg gta ttt ttc gtt tcg gag ctg gtt ggc ggc ttc			912
Leu Thr Ser Leu Leu Val Phe Phe Val Ser Glu Leu Val Gly Gly Phe			
290	295	300	
ggc att gcg atc gtg gtg ttc atg aac cac tac cca ctg gag aag atc			960
Gly Ile Ala Ile Val Val Phe Met Asn His Tyr Pro Leu Glu Lys Ile			
305	310	315	320
ggg gac tcg gtc tgg gat ggc cat gga ttc tcg gtt ggc cag atc cat			1008
Gly Asp Ser Val Trp Asp Gly His Gly Phe Ser Val Gly Gln Ile His			
325	330	335	
gag acc atg aac att cgg cga ggg att atc aca gat tgg ttt ttc gga			1056
Glu Thr Met Asn Ile Arg Arg Gly Ile Ile Thr Asp Trp Phe Phe Gly			
340	345	350	
ggc ttg aac tac cag atc gag cac cat ttg tgg ccg acc ctc cct cgc			1104
Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Trp Pro Thr Leu Pro Arg			
355	360	365	
cac aac ctg aca gcg gtt agc tac cag gtg gaa cag ctg tgc cag aag			1152
His Asn Leu Thr Ala Val Ser Tyr Gln Val Glu Gln Leu Cys Gln Lys			

ctg ctg cgc tat ctg gcg gtg ttc gcc cgg atg gcg gag aag caa ccc 1248  
Leu Leu Arg Tyr Leu Ala Val Phe Ala Arg Met Ala Glu Lys Gln Pro  
405 410 415

gcg ggg aag gct cta taa 1266  
Ala Gly Lys Ala Leu  
420

**<210> 2**

<211> 421

<212> PRT

<213> Euglena gracilis

<400> 2

Met Lys Ser Lys Arg Gln Ala Leu Pro Leu Thr Ile Asp Gly Thr Thr  
1 5 10 15

Tyr Asp Val Ser Ala Trp Val Asn Phe His Pro Gly Gly Ala Glu Ile  
20 25 30

Ile Glu Asn Tyr Gln Gly Arg Asp Ala Thr Asp Ala Phe Met Val Met  
35 40 45

His Ser Gln Glu Ala Phe Asp Lys Leu Lys Arg Met Pro Lys Ile Asn  
50 55 60

Pro Ser Ser Glu Leu Pro Pro Gln Ala Ala Val Asn Glu Ala Gln Glu  
65 70 75 80

Asp Phe Arg Lys Leu Arg Glu Glu Leu Ile Ala Thr Gly Met Phe Asp  
85 90 95

Ala Ser Pro Leu Trp Tyr Ser Tyr Lys Ile Ser Thr Thr Leu Gly Leu  
100 105 110

Gly Val Leu Gly Tyr Phe Leu Met Val Gln Tyr Gln Met Tyr Phe Ile  
115 120 125

Gly Ala Val Leu Leu Gly Met His Tyr Gln Gln Met Gly Trp Leu Ser  
130 135 140

His Asp Ile Cys His His Gln Thr Phe Lys Asn Arg Asn Trp Asn Asn  
145 150 155 160

Leu Val Gly Leu Val Phe Gly Asn Gly Leu Gln Gly Phe Ser Val Thr

165		170		175
Cys Trp Lys Asp Arg His Asn Ala His His Ser Ala Thr Asn Val Gln	180	185		190
Gly His Asp Pro Asp Ile Asp Asn Leu Pro Leu Leu Ala Trp Ser Glu	195	200		205
Asp Asp Val Thr Arg Ala Ser Pro Ile Ser Arg Lys Leu Ile Gln Phe	210	215	220	
Gln Gln Tyr Tyr Phe Leu Val Ile Cys Ile Leu Leu Arg Phe Ile Trp	225	230	235	240
Cys Phe Gln Ser Val Leu Thr Val Arg Ser Leu Lys Asp Arg Asp Asn	245	250	255	
Gln Phe Tyr Arg Ser Gln Tyr Lys Lys Glu Ala Ile Gly Leu Ala Leu	260	265	270	
His Trp Thr Leu Lys Ala Leu Phe His Leu Phe Phe Met Pro Ser Ile	275	280	285	
Leu Thr Ser Leu Leu Val Phe Phe Val Ser Glu Leu Val Gly Gly Phe	290	295	300	
Gly Ile Ala Ile Val Val Phe Met Asn His Tyr Pro Leu Glu Lys Ile	305	310	315	320
Gly Asp Ser Val Trp Asp Gly His Gly Phe Ser Val Gly Gln Ile His	325	330	335	
Glu Thr Met Asn Ile Arg Arg Gly Ile Ile Thr Asp Trp Phe Phe Gly	340	345	350	
Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Glu His His Leu Trp Pro Thr Leu Pro Arg	355	360	365	
His Asn Leu Thr Ala Val Ser Tyr Gln Val Glu Gln Leu Cys Gln Lys	370	375	380	
His Asn Leu Pro Tyr Arg Asn Pro Leu Pro His Glu Gly Leu Val Ile	385	390	395	400
Leu Leu Arg Tyr Leu Ala Val Phe Ala Arg Met Ala Glu Lys Gln Pro	405	410	415	
Ala Gly Lys Ala Leu	420			

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 777

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Isochrysis galbana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(777)

&lt;223&gt; Delta-9-Elongase

&lt;400&gt; 3

atg gcc ctc gca aac gac gcg gga gag cgc atc tgg gcg gct gtg acc	48
Met Ala Leu Ala Asn Asp Ala Gly Glu Arg Ile Trp Ala Ala Val Thr	
1 5 10 15	
gac ccg gaa atc ctc att ggc acc ttc tcg tac ttg cta ctc aaa ccg	96
Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro	
20 25 30	
ctg ctc cgc aat tcc ggg ctg gtg gat gag aag aag ggc gca tac agg	144
Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Arg	
35 40 45	
acg tcc atg atc tgg tac aac gtt ctg ctg gcg ctc ttc tct gcg ctg	192
Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Leu Leu Ala Leu Phe Ser Ala Leu	
50 55 60	
agc ttc tac gtg acg gcg acc gcc ctc ggc tgg gac tat ggt acg ggc	240
Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Tyr Gly Thr Gly	
65 70 75 80	
gcg tgg ctg cgc agg caa acc ggc gac aca ccg cag ccg ctc ttc cag	288
Ala Trp Leu Arg Arg Gln Thr Gly Asp Thr Pro Gln Pro Leu Phe Gln	
85 90 95	
tgc ccg tcc ccg gtt tgg gac tcg aag ctc ttc aca tgg acc gcc aag	336
Cys Pro Ser Pro Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Thr Trp Thr Ala Lys	
100 105 110	
gca ttc tat tac tcc aag tac gtg gag tac ctc gac acg gcc tgg ctg	384
Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu	
115 120 125	
agg gtc tcc ttt ctc cag gcc ttc cac cac ttt ggc gcg ccg tgg gat	432
Arg Val Ser Phe Leu Gln Ala Phe His His Phe Gly Ala Pro Trp Asp	
130 135 140	
gtg tac ctc ggc att ccg ctg cac aac gag ggc gta tgg atc ttc atg	480
Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu His Asn Glu Gly Val Trp Ile Phe Met	
145 150 155 160	
ttt ttc aac tcg ttc att cac acc atc atg tac acc tac tac ggc ctc	528
Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr Gly Leu	
165 170 175	
acc gcc gcc ggg tat aag ttc aag gcc aag ccg ctc atc acc gcg atg	576

6

Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Phe Lys Ala Lys Pro Leu Ile Thr Ala Met  
 180 185 190

cag atc tgc cag ttc gtg ggc ggc ttc ctg ttg gtc tgg gac tac atc 624  
 Gln Ile Cys Gln Phe Val Gly Gly Phe Leu Leu Val Trp Asp Tyr Ile  
 195 200 205

aac gtc ccc tgc ttc aac tcg gac aaa ggg aag ttg ttc agc tgg gct 672  
 Asn Val Pro Cys Phe Asn Ser Asp Lys Gly Lys Leu Phe Ser Trp Ala  
 210 215 220

ttc aac tat gca tac gtc ggc tcg gtc ttc ttg ctc ttc tgc cac ttt 720  
 Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu Leu Phe Cys His Phe  
 225 230 235 240

ttc tac cag gac aac ttg gca acg aag aaa tcg gcc aag gcg ggc aag 768  
 Phe Tyr Gln Asp Asn Leu Ala Thr Lys Lys Ser Ala Lys Ala Gly Lys  
 245 250 255

cag ctc tag 777  
 Gln Leu

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 258

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Isochrysis galbana

&lt;400&gt; 4

Met Ala Leu Ala Asn Asp Ala Gly Glu Arg Ile Trp Ala Ala Val Thr  
 1 5 10 15

Asp Pro Glu Ile Leu Ile Gly Thr Phe Ser Tyr Leu Leu Leu Lys Pro  
 20 25 30

Leu Leu Arg Asn Ser Gly Leu Val Asp Glu Lys Lys Gly Ala Tyr Arg  
 35 40 45

Thr Ser Met Ile Trp Tyr Asn Val Leu Leu Ala Leu Phe Ser Ala Leu  
 50 55 60

Ser Phe Tyr Val Thr Ala Thr Ala Leu Gly Trp Asp Tyr Gly Thr Gly  
 65 70 75 80

Ala Trp Leu Arg Arg Gln Thr Gly Asp Thr Pro Gln Pro Leu Phe Gln  
 85 90 95

Cys Pro Ser Pro Val Trp Asp Ser Lys Leu Phe Thr Trp Thr Ala Lys  
 100 105 110

Ala Phe Tyr Tyr Ser Lys Tyr Val Glu Tyr Leu Asp Thr Ala Trp Leu  
 115 120 125

7

Arg Val Ser Phe Leu Gln Ala Phe His His Phe Gly Ala Pro Trp Asp  
 130 135 140

Val Tyr Leu Gly Ile Arg Leu His Asn Glu Gly Val Trp Ile Phe Met  
 145 150 155 160

Phe Phe Asn Ser Phe Ile His Thr Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr Gly Leu  
 165 170 175

Thr Ala Ala Gly Tyr Lys Phe Lys Ala Lys Pro Leu Ile Thr Ala Met  
 180 185 190

Gln Ile Cys Gln Phe Val Gly Gly Phe Leu Leu Val Trp Asp Tyr Ile  
 195 200 205

Asn Val Pro Cys Phe Asn Ser Asp Lys Gly Lys Leu Phe Ser Trp Ala  
 210 215 220

Phe Asn Tyr Ala Tyr Val Gly Ser Val Phe Leu Leu Phe Cys His Phe  
 225 230 235 240

Phe Tyr Gln Asp Asn Leu Ala Thr Lys Lys Ser Ala Lys Ala Gly Lys  
 245 250 255

Gln Leu

<210> 5

<211> 1410

<212> DNA

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1410)

<223> Delta-5-Desaturase

<400> 5

atg gct ccg gat gcg gat aag ctt cga caa cgc cag acg act gcg gta 48  
 Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val  
 1 5 10 15

gcg aag cac aat gct gct acc ata tcg acg cag gaa cgc ctt tgc agt 96  
 Ala Lys His Asn Ala Ala Thr Ile Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser  
 20 25 30

ctg tct tcg ctc aaa ggc gaa gaa gtc tgc atc gac gga atc atc tat 144  
 Leu Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr

35	40	45	
gac ctc caa tca ttc gat cat ccc ggg ggt gaa acg atc aaa atg ttt Asp Leu Gln Ser Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe 50 55 60			192
ggt ggc aac gat gtc act gta cag tac aag atg att cac ccg tac cat Gly Gly Asn Asp Val Thr Val Gln Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His 65 70 75 80			240
acc gag aag cat ttg gaa aag atg aag cgt gtc ggc aag gtg acg gat Thr Glu Lys His Leu Glu Lys Met Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp 85 90 95			288
ttc gtc tgc gag tac aag ttc gat acc gaa ttt gaa cgc gaa atc aaa Phe Val Cys Glu Tyr Lys Phe Asp Thr Glu Phe Glu Arg Glu Ile Lys 100 105 110			336
cga gaa gtc ttc aag att gtg cga cga ggc aag gat ttc ggt act ttg Arg Glu Val Phe Lys Ile Val Arg Arg Gly Lys Asp Phe Gly Thr Leu 115 120 125			384
gga tgg ttc ttc cgt gcg ttt tgc tac att gcc att ttc ttc tac ctg Gly Trp Phe Phe Arg Ala Phe Cys Tyr Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Leu 130 135 140			432
cag tac cat tgg gtc acc acg gga acc tct tgg ctg ctg gcc gtg gcc Gln Tyr His Trp Val Thr Thr Gly Thr Ser Trp Leu Leu Ala Val Ala 145 150 155 160			480
tac gga atc tcc caa gcg atg att ggc atg aat gtc cag cac gat gcc Tyr Gly Ile Ser Gln Ala Met Ile Gly Met Asn Val Gln His Asp Ala 165 170 175			528
aac cac ggg gcc acc tcc aag cgt ccc tgg gtc aac gac atg cta ggc Asn His Gly Ala Thr Ser Lys Arg Pro Trp Val Asn Asp Met Leu Gly 180 185 190			576
ctc ggt gcg gat ttt att ggt ggt tcc aag tgg ctc tgg cag gaa caa Leu Gly Ala Asp Phe Ile Gly Gly Ser Lys Trp Leu Trp Gln Glu Gln 195 200 205			624
cac tgg acc cac cac gct tac acc aat cac gcc gag atg gat ccc gat His Trp Thr His His Ala Tyr Thr Asn His Ala Glu Met Asp Pro Asp 210 215 220			672
agc ttt ggt gcc gaa cca atg ctc cta ttc aac gac tat ccc ttg gat Ser Phe Gly Ala Glu Pro Met Leu Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Leu Asp 225 230 235 240			720
cat ccc gct cgt acc tgg cta cat cgc ttt caa gca ttc ttt tac atg His Pro Ala Arg Thr Trp Leu His Arg Phe Gln Ala Phe Phe Tyr Met 245 250 255			768
ccc gtc ttg gct gga tac tgg ttg tcc gct gtc ttc aat cca caa att Pro Val Leu Ala Gly Tyr Trp Leu Ser Ala Val Phe Asn Pro Gln Ile 260 265 270			816
ctt gac ctc cag caa cgc ggc gca ctt tcc gtc ggt atc cgt ctc gac Leu Asp Leu Gln Gln Arg Gly Ala Leu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asp 275 280 285			864
aac gct ttc att cac tcg cga cgc aag tat gcg gtt ttc tgg cgg gct Asn Ala Phe Ile His Ser Arg Arg Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala 290 295 300			912

gtg tac att gcg gtg aac gtg att gct ccg ttt tac aca aac tcc ggc 960  
Val Tyr Ile Ala Val Asn Val Ile Ala Pro Phe Tyr Thr Asn Ser Gly  
305 310 315 320

ctc gaa tgg tcc tgg cgt gtc ttt gga aac atc atg ctc atg ggt gtg 1008  
Leu Glu Trp Ser Trp Arg Val Phe Gly Asn Ile Met Leu Met Gly Val  
325 330 335

gcg gaa tcg ctc gcg ctg gcg gtc ctg ttt tcg ttg tcg cac aat ttc 1056  
Ala Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe  
340 345 350

gaa tcc gcg gat cgc gat ccg acc gcc cca ctg aaa aag acg gga gaa 1104  
Glu Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu  
355 360 365

cca gtc gac tgg ttc aag aca cag gtc gaa act tcc tgc act tac ggt 1152  
Pro Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly  
370 375 380

gga ttc ctt tcc ggt tgc ttc acg gga ggt ctc aac ttt cag gtt gaa 1200  
Gly Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu  
385 390 395 400

cac cac ttg ttc cca cgc atg agc agc gct tgg tat ccc tac att gcc 1248  
His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala  
405 410 415

ccc aag gtc cgc gaa att tgc gcc aaa cac gcc gtc cac tac gcc tac 1296  
Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr  
420 425 430

tac ccg tgg atc cac caa aac ttt ctc tcc acc gtc cgc tac atg cac 1344  
Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His  
435 440 445

gcg gcc ggg acc ggt gcc aac tgg cgc cag atg gcc aga gaa aat ccc 1392  
Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro  
450 455 460

ttg acc gga cgg gcg taa 1410  
Leu Thr Gly Arg Ala  
465

&lt;210&gt; 6

&lt;211&gt; 469

&lt;212&gt; PRT

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

&lt;400&gt; 6

Met Ala Pro Asp Ala Asp Lys Leu Arg Gln Arg Gln Thr Thr Ala Val  
1 5 10 15

Ala Lys His Asn Ala Ala Thr Ile Ser Thr Gln Glu Arg Leu Cys Ser  
20 25 30

Leu Ser Ser Leu Lys Gly Glu Glu Val Cys Ile Asp Gly Ile Ile Tyr  
35 40 45



Asp Leu Gln Ser Phe Asp His Pro Gly Gly Glu Thr Ile Lys Met Phe  
 50 55 60

Gly Gly Asn Asp Val Thr Val Gln Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His  
 65 70 75 80

Thr Glu Lys His Leu Glu Lys Met Lys Arg Val Gly Lys Val Thr Asp  
 85 90 95

Phe Val Cys Glu Tyr Lys Phe Asp Thr Glu Phe Glu Arg Glu Ile Lys  
 100 105 110

Arg Glu Val Phe Lys Ile Val Arg Arg Gly Lys Asp Phe Gly Thr Leu  
 115 120 125

Gly Trp Phe Phe Arg Ala Phe Cys Tyr Ile Ala Ile Phe Phe Tyr Leu  
 130 135 140

Gln Tyr His Trp Val Thr Thr Gly Thr Ser Trp Leu Leu Ala Val Ala  
 145 150 155 160

Tyr Gly Ile Ser Gln Ala Met Ile Gly Met Asn Val Gln His Asp Ala  
 165 170 175

Asn His Gly Ala Thr Ser Lys Arg Pro Trp Val Asn Asp Met Leu Gly  
 180 185 190

Leu Gly Ala Asp Phe Ile Gly Gly Ser Lys Trp Leu Trp Gln Glu Gln  
 195 200 205

His Trp Thr His His Ala Tyr Thr Asn His Ala Glu Met Asp Pro Asp  
 210 215 220

Ser Phe Gly Ala Glu Pro Met Leu Leu Phe Asn Asp Tyr Pro Leu Asp  
 225 230 235 240

His Pro Ala Arg Thr Trp Leu His Arg Phe Gln Ala Phe Phe Tyr Met  
 245 250 255

Pro Val Leu Ala Gly Tyr Trp Leu Ser Ala Val Phe Asn Pro Gln Ile  
 260 265 270

Leu Asp Leu Gln Gln Arg Gly Ala Leu Ser Val Gly Ile Arg Leu Asp  
 275 280 285

Asn Ala Phe Ile His Ser Arg Arg Lys Tyr Ala Val Phe Trp Arg Ala  
 290 295 300

Val Tyr Ile Ala Val Asn Val Ile Ala Pro Phe Tyr Thr Asn Ser Gly  
 305 310 315 320

Ala Glu Ser Leu Ala Leu Ala Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe  
340 345 350

Glu Ser Ala Asp Arg Asp Pro Thr Ala Pro Leu Lys Lys Thr Gly Glu  
355 360 365

Pro Val Asp Trp Phe Lys Thr Gln Val Glu Thr Ser Cys Thr Tyr Gly  
370 375 380

Gly Phe Leu Ser Gly Cys Phe Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu  
385 390 395 400

His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala  
405 410 415

Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Ala Lys His Gly Val His Tyr Ala Tyr  
420 425 430

Tyr Pro Trp Ile His Gln Asn Phe Leu Ser Thr Val Arg Tyr Met His  
435 440 445

Ala Ala Gly Thr Gly Ala Asn Trp Arg Gln Met Ala Arg Glu Asn Pro  
450 455 460

Leu Thr Gly Arg Ala  
465

<210> 7

<211> 1344

<212> DNA

<213> Ceratodon purpureus

**<220>**

<221> CDS

<222> (1) .. (1344)

<223> Delta-5-Desaturase

<400> 7

```

<400>      7
atg gta tta cga gag caa gag cat gag cca ttc ttc att aaa att gat
Met Val Leu Arg  Glu Gln Glu His Glu Pro Phe Phe Ile Lys Ile Asp
1              5              10              15

```

48

gga aaa tgg tgt caa att gac gat gct gtc ctg aga tca cat cca ggt

96

## 12

Gly	Lys	Trp	Cys	Gln	Ile	Asp	Asp	Ala	Val	Leu	Arg	Ser	His	Pro	Gly		
			20					25					30				
ggt	agt	gca	att	act	acc	tat	aaa	aat	atg	gat	gcc	act	acc	gta	ttc	144	
Gly	Ser	Ala	Ile	Thr	Thr	Tyr	Lys	Asn	Met	Asp	Ala	Thr	Thr	Val	Phe		
		35					40				45						
cac	aca	ttc	cat	act	ggt	tct	aaa	gaa	gcg	tat	caa	tgg	ctg	aca	gaa	192	
His	Thr	Phe	His	Thr	Gly	Ser	Lys	Glu	Ala	Tyr	Gln	Trp	Leu	Thr	Glu		
		50				55					60						
ttg	aaa	aaa	gag	tgc	cct	aca	caa	gaa	cca	gag	atc	cca	gat	att	aag	240	
Leu	Lys	Lys	Glu	Cys	Pro	Thr	Gln	Glu	Pro	Glu	Ile	Pro	Asp	Ile	Lys		
65					70				75					80			
gat	gac	cca	atc	aaa	gga	att	gat	gat	gtg	aac	atg	gga	act	ttc	aat	288	
Asp	Asp	Pro	Ile	Lys	Gly	Ile	Asp	Asp	Val	Asn	Met	Gly	Thr	Phe	Asn		
				85					90					95			
att	tct	gag	aaa	cga	tct	gcc	caa	ata	aat	aaa	agt	ttc	act	gat	cta	336	
Ile	Ser	Glu	Lys	Arg	Ser	Ala	Gln	Ile	Asn	Lys	Ser	Phe	Thr	Asp	Leu		
			100					105					110				
cgt	atg	cga	gtt	cgt	gca	gaa	gga	ctt	atg	gat	gga	tct	cct	ttg	ttc	384	
Arg	Met	Arg	Val	Arg	Ala	Glu	Gly	Leu	Met	Asp	Gly	Ser	Pro	Leu	Phe		
		115				120						125					
tac	att	aga	aaa	att	ctt	gaa	aca	atc	ttc	aca	att	ctt	ttt	gca	ttc	432	
Tyr	Ile	Arg	Lys	Ile	Leu	Glu	Thr	Ile	Phe	Thr	Ile	Leu	Phe	Ala	Phe		
		130				135					140						
tac	ctt	caa	tac	cac	aca	tat	tat	ctt	cca	tca	gct	att	cta	atg	gga	480	
Tyr	Leu	Gln	Tyr	His	Thr	Tyr	Tyr	Leu	Pro	Ser	Ala	Ile	Leu	Met	Gly		
145					150				155					160			
gtt	gcg	tgg	caa	caa	ttg	gga	tgg	tta	atc	cat	gaa	ttc	gca	cat	cat	528	
Val	Ala	Trp	Gln	Gln	Leu	Gly	Trp	Leu	Ile	His	Glu	Phe	Ala	His	His		
				165					170					175			
cag	ttg	ttc	aaa	aac	aga	tac	tac	aat	gat	ttg	gcc	agc	tat	ttc	gtt	576	
Gln	Leu	Phe	Lys	Asn	Arg	Tyr	Tyr	Asn	Asp	Leu	Ala	Ser	Tyr	Phe	Val		
			180					185					190				
gga	aac	ttt	tta	caa	gga	ttc	tca	tct	ggt	ggt	tgg	aaa	gag	cag	cac	624	
Gly	Asn	Phe	Leu	Gln	Gly	Phe	Ser	Ser	Gly	Gly	Trp	Lys	Glu	Gln	His		
		195					200					205					
aat	gtg	cat	cac	gca	gcc	aca	aat	gtt	gtt	gga	cga	gac	gga	gat	ctt	672	
Asn	Val	His	His	Ala	Ala	Thr	Asn	Val	Val	Gly	Arg	Asp	Gly	Asp	Leu		
		210				215					220						
gat	tta	gtc	cca	ttc	tat	gct	aca	gtg	gca	gaa	cat	ctc	aac	aat	tat	720	
Asp	Leu	Val	Pro	Phe	Tyr	Ala	Thr	Val	Ala	Glu	His	Leu	Asn	Asn	Tyr		
225					230					235				240			
tct	cag	gat	tca	tgg	gtt	atg	act	cta	ttc	aga	tgg	caa	cat	gtt	cat	768	
Ser	Gln	Asp	Ser	Trp	Val	Met	Thr	Leu	Phe	Arg	Trp	Gln	His	Val	His		
				245					250					255			
tgg	aca	ttc	atg	tta	cca	ttc	ctc	cgt	ctc	tgc	tgg	ctt	ctt	cag	tca	816	
Trp	Thr	Phe	Met	Leu	Pro	Phe	Leu	Arg	Leu	Ser	Trp	Leu	Leu	Gln	Ser		
			260					265					270				
atc	att	ttt	gtt	agt	cag	atg	cca	act	cat	tat	tat	gac	tat	tac	aga	864	
Ile	Ile	Phe	Val	Ser	Gln	Met	Pro	Thr	His	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Tyr	Arg		
		275					280					285					
aat	act	gcg	att	tat	gaa	cag	gtt	ggt	ctc	tct	ttg	cac	tgg	gct	tgg	912	

## 13

Asn Thr Ala Ile Tyr Glu Gln Val Gly Leu Ser Leu His Trp Ala Trp  
 290 295 300  
 tca ttg ggt caa ttg tat ttc cta ccc gat tgg tca act aga ata atg 960  
 Ser Leu Gly Gln Leu Tyr Phe Leu Pro Asp Trp Ser Thr Arg Ile Met  
 305 310 315  
 ttc ttc ctt gtt tct cat ctt gtt gga ggt ttc ctg ctc tct cat gta 1008  
 Phe Phe Leu Val Ser His Leu Val Gly Gly Phe Leu Leu Ser His Val  
 325 330 335  
 gtt act ttc aat cat tat tca gtg gag aag ttt gca ttg agc tcg aac 1056  
 Val Thr Phe Asn His Tyr Ser Val Glu Lys Phe Ala Leu Ser Ser Asn  
 340 345 350  
 atc atg tca aat tac gct tgt ctt caa atc atg acc aca aga aat atg 1104  
 Ile Met Ser Asn Tyr Ala Cys Leu Gln Ile Met Thr Thr Arg Asn Met  
 355 360 365  
 aga cct gga aga ttc att gac tgg ctt tgg gga ggt ctt aac tat cag 1152  
 Arg Pro Gly Arg Phe Ile Asp Trp Leu Trp Gly Gly Leu Asn Tyr Gln  
 370 375 380  
 att gag cac cat ctt ttc cca acg atg cca cga cac aac ttg aac act 1200  
 Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Thr  
 385 390 395 400  
 gtt atg cca ctt gtt aag gag ttt gca gca gca aat ggt tta cca tac 1248  
 Val Met Pro Leu Val Lys Glu Phe Ala Ala Ala Asn Gly Leu Pro Tyr  
 405 410 415  
 atg gtc gac gat tat ttc aca gga ttc tgg ctt gaa att gag caa ttc 1296  
 Met Val Asp Asp Tyr Phe Thr Gly Phe Trp Leu Glu Ile Glu Gln Phe  
 420 425 430  
 cga aat att gca aat gtt gct gct aaa ttg act aaa aag att gcc tag 1344  
 Arg Asn Ile Ala Asn Val Ala Ala Lys Leu Thr Lys Lys Ile Ala  
 435 440 445  
  
 <210> 8  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> *Ceratodon purpureus*  
  
 <400> 8  
 Met Val Leu Arg Glu Gln Glu His Glu Pro Phe Phe Ile Lys Ile Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Lys Trp Cys Gln Ile Asp Asp Ala Val Leu Arg Ser His Pro Gly  
 20 25 30  
 Gly Ser Ala Ile Thr Thr Tyr Lys Asn Met Asp Ala Thr Thr Val Phe  
 35 40 45  
 His Thr Phe His Thr Gly Ser Lys Glu Ala Tyr Gln Trp Leu Thr Glu  
 50 55 60

14

Leu Lys Lys Glu Cys Pro Thr Gln Glu Pro Glu Ile Pro Asp Ile Lys  
65 70 75 80

Asp Asp Pro Ile Lys Gly Ile Asp Asp Val Asn Met Gly Thr Phe Asn  
85 90 95

Ile Ser Glu Lys Arg Ser Ala Gln Ile Asn Lys Ser Phe Thr Asp Leu  
100 105 110

Arg Met Arg Val Arg Ala Glu Gly Leu Met Asp Gly Ser Pro Leu Phe  
115 120 125

Tyr Ile Arg Lys Ile Leu Glu Thr Ile Phe Thr Ile Leu Phe Ala Phe  
130 135 140

Tyr Leu Gln Tyr His Thr Tyr Tyr Leu Pro Ser Ala Ile Leu Met Gly  
145 150 155 160

Val Ala Trp Gln Gln Leu Gly Trp Leu Ile His Glu Phe Ala His His  
165 170 175

Gln Leu Phe Lys Asn Arg Tyr Tyr Asn Asp Leu Ala Ser Tyr Phe Val  
180 185 190

Gly Asn Phe Leu Gln Gly Phe Ser Ser Gly Gly Trp Lys Glu Gln His  
195 200 205

Asn Val His His Ala Ala Thr Asn Val Val Gly Arg Asp Gly Asp Leu  
210 215 220

Asp Leu Val Pro Phe Tyr Ala Thr Val Ala Glu His Leu Asn Asn Tyr  
225 230 235 240

Ser Gln Asp Ser Trp Val Met Thr Leu Phe Arg Trp Gln His Val His  
245 250 255

Trp Thr Phe Met Leu Pro Phe Leu Arg Leu Ser Trp Leu Leu Gln Ser  
260 265 270

Ile Ile Phe Val Ser Gln Met Pro Thr His Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Arg  
275 280 285

Asn Thr Ala Ile Tyr Glu Gln Val Gly Leu Ser Leu His Trp Ala Trp  
290 295 300

Ser Leu Gly Gln Leu Tyr Phe Leu Pro Asp Trp Ser Thr Arg Ile Met  
305 310 315 320

Phe Phe Leu Val Ser His Leu Val Gly Gly Phe Leu Leu Ser His Val  
325 330 335

Val Thr Phe Asn His Tyr Ser Val Glu Lys Phe Ala Leu Ser Ser Asn  
340 345 350

Ile Met Ser Asn Tyr Ala Cys Leu Gln Ile Met Thr Thr Arg Asn Met  
355 360 365

Arg Pro Gly Arg Phe Ile Asp Trp Leu Trp Gly Gly Leu Asn Tyr Gln  
370 375 380

Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Thr  
385 390 395 400

Val Met Pro Leu Val Lys Glu Phe Ala Ala Ala Asn Gly Leu Pro Tyr  
405 410 415

Met Val Asp Asp Tyr Phe Thr Gly Phe Trp Leu Glu Ile Glu Gln Phe  
420 425 430

Arg Asn Ile Ala Asn Val Ala Ala Lys Leu Thr Lys Lys Ile Ala  
435 440 445

<210> 9

<211> 1443

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1443)

<223> Delta-5-Desaturase

<400> 9	
atg gcg ccc cac tct gcg gat act gct ggg ctc gtg cct tct gac gaa	48
Met Ala Pro His Ser Ala Asp Thr Ala Gly Leu Val Pro Ser Asp Glu	
1 5 10 15	
ttg agg cta cga acg tcg aat tca aag ggt ccc gaa caa gag caa act	96
Leu Arg Leu Arg Thr Ser Asn Ser Lys Gly Pro Glu Gln Glu Gln Thr	
20 25 30	
ttg aag aag tac acc ctt gaa gat gtc agc cgc cac aac acc cca gca	144
Leu Lys Lys Tyr Thr Leu Glu Asp Val Ser Arg His Asn Thr Pro Ala	
35 40 45	
gat tgt tgg ttg gtg ata tgg ggc aaa gtc tac gat gtc aca agc tgg	192
Asp Cys Trp Leu Val Ile Trp Gly Lys Val Tyr Asp Val Thr Ser Trp	
50 55 60	
att ccc aat cat ccg ggg ggc agt ctc atc cac gta aaa gca ggg cag	240
Ile Pro Asn His Pro Gly Gly Ser Leu Ile His Val Lys Ala Gly Gln	

16

65	70	75	80	
gat tcc act cag ctt ttc gat tcc tat cac ccc ctt tat gtc agg aaa				288
Asp Ser Thr Gln Leu Phe Asp Ser Tyr His Pro Leu Tyr Val Arg Lys	85	90	95	
atg ctc gcg aag tac tgt att ggg gaa tta gta ccg tct gct ggt gat				336
Met Leu Ala Lys Tyr Cys Ile Gly Glu Leu Val Pro Ser Ala Gly Asp	100	105	110	
gac aag ttt aag aaa gca act ctg gag tat gca gat gcc gaa aat gaa				384
Asp Lys Phe Lys Lys Ala Thr Leu Glu Tyr Ala Asp Ala Glu Asn Glu	115	120	125	
gat ttc tat ttg gtt gtg aag caa cga gtt gaa tct tat ttc aag agt				432
Asp Phe Tyr Leu Val Val Lys Gln Arg Val Glu Ser Tyr Phe Lys Ser	130	135	140	
aac aag ata aac ccc caa att cat cca cat atg atc ctg aag tca ttg				480
Asn Lys Ile Asn Pro Gln Ile His Pro His Met Ile Leu Lys Ser Leu	145	150	155	160
ttc att ctt ggg gga tat ttc gcc agt tac tat tta gcg ttc ttc tgg				528
Phe Ile Leu Gly Gly Tyr Phe Ala Ser Tyr Tyr Leu Ala Phe Phe Trp	165	170	175	
tct tca agt gtc ctt gtt tct ttg ttt ttc gca ttg tgg atg ggg ttc				576
Ser Ser Ser Val Leu Val Ser Leu Phe Phe Ala Leu Trp Met Gly Phe	180	185	190	
ttc gca gcg gaa gtc ggc gtg tcg att caa cat gat gga aat cat ggt				624
Phe Ala Ala Glu Val Gly Val Ser Ile Gln His Asp Gly Asn His Gly	195	200	205	
tca tac act aaa tgg cgt ggc ttt gga tat atc atg gga gcc tcc cta				672
Ser Tyr Thr Lys Trp Arg Gly Phe Gly Tyr Ile Met Gly Ala Ser Leu	210	215	220	
gat cta gtc gga gcc agt agc ttc atg tgg aga cag caa cac gtt gtg				720
Asp Leu Val Gly Ala Ser Ser Phe Met Trp Arg Gln Gln His Val Val	225	230	235	240
gga cat cac tcg ttt aca aat gtg gac aac tac gat cct gat att cgt				768
Gly His His Ser Phe Thr Asn Val Asp Asn Tyr Asp Pro Asp Ile Arg	245	250	255	
gtg aaa gat cca gat gtc agg agg gtt gcg acc aca caa cca aga caa				816
Val Lys Asp Pro Asp Val Arg Arg Val Ala Thr Thr Gln Pro Arg Gln	260	265	270	
tgg tat cat gcg tat cag cat atc tac ctg gca gta tta tat gga act				864
Trp Tyr His Ala Tyr Gln His Ile Tyr Leu Ala Val Leu Tyr Gly Thr	275	280	285	
cta gct ctt aag agt att ttt cta gat gat ttc ctt gcg tac ttc aca				912
Leu Ala Leu Lys Ser Ile Phe Leu Asp Asp Phe Leu Ala Tyr Phe Thr	290	295	300	
gga tca att ggc cct gtc aag gtg gcg aaa atg acc ccc ctg gag ttc				960
Gly Ser Ile Gly Pro Val Lys Val Ala Lys Met Thr Pro Leu Glu Phe	305	310	315	320
aac atc ttc ttt cag gga aag ctg cta tat gcg ttc tac atg ttc gtg				1008
Asn Ile Phe Phe Gln Gly Lys Leu Leu Tyr Ala Phe Tyr Met Phe Val	325	330	335	
ttg cca tct gtg tac ggt gtt cac tcc gga gga act ttc ttg gca cta				1056
Leu Pro Ser Val Tyr Gly Val His Ser Gly Gly Thr Phe Leu Ala Leu				

340	345	350	
tat gtg gct tct cag ctc att aca ggt tgg atg tta gct ttt ctt ttt			1104
Tyr Val Ala Ser Gln Leu Ile Thr Gly Trp Met Leu Ala Phe Leu Phe			
355	360	365	
caa gta gca cat gtc gtg gat gat gtt gca ttt cct aca cca gaa ggt			1152
Gln Val Ala His Val Val Asp Asp Val Ala Phe Pro Thr Pro Glu Gly			
370	375	380	
ggg aag gtg aag gga gga tgg gct gca atg cag gtt gca aca act acg			1200
Gly Lys Val Lys Gly Trp Ala Ala Met Gln Val Ala Thr Thr Thr			
385	390	395	400
gat ttc agt cca cgc tca tgg ttc tgg ggt cat gtc tct gga gga tta			1248
Asp Phe Ser Pro Arg Ser Trp Phe Trp Gly His Val Ser Gly Gly Leu			
405	410	415	
aac aac caa att gag cat cat ctg ttt cca gga gtg tgc cat gtt cat			1296
Asn Asn Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Gly Val Cys His Val His			
420	425	430	
tat cca gcc att cag cct att gtc gag aag acg tgc aag gaa ttc gat			1344
Tyr Pro Ala Ile Gln Pro Ile Val Glu Lys Thr Cys Lys Glu Phe Asp			
435	440	445	
gtg cct tat gta gcc tac cca act ttt tgg act gcg ttg aga gcc cac			1392
Val Pro Tyr Val Ala Tyr Pro Thr Phe Trp Thr Ala Leu Arg Ala His			
450	455	460	
ttt gcg cat ttg aaa aag gtt gga ttg aca gag ttt cgg ctc gat ggc			1440
Phe Ala His Leu Lys Lys Val Gly Leu Thr Glu Phe Arg Leu Asp Gly			
465	470	475	480
tga			1443
<210>	10		
<211>	480		
<212>	PRT		
<213>	Physcomitrella patens		
<400>	10		
Met Ala Pro His Ser Ala Asp Thr Ala Gly Leu Val Pro Ser Asp Glu			
1	5	10	15
Leu Arg Leu Arg Thr Ser Asn Ser Lys Gly Pro Glu Gln Glu Gln Thr			
20	25	30	
Leu Lys Lys Tyr Thr Leu Glu Asp Val Ser Arg His Asn Thr Pro Ala			
35	40	45	
Asp Cys Trp Leu Val Ile Trp Gly Lys Val Tyr Asp Val Thr Ser Trp			
50	55	60	
Ile Pro Asn His Pro Gly Gly Ser Leu Ile His Val Lys Ala Gly Gln			
65	70	75	80



Asp Ser Thr Gln Leu Phe Asp Ser Tyr His Pro Leu Tyr Val Arg Lys  
                                     85                                    90                                    95

Met Leu Ala Lys Tyr Cys Ile Gly Glu Leu Val Pro Ser Ala Gly Asp  
                                     100                                    105                                    110

Asp Lys Phe Lys Lys Ala Thr Leu Glu Tyr Ala Asp Ala Glu Asn Glu  
                                     115                                    120                                    125

Asp Phe Tyr Leu Val Val Lys Gln Arg Val Glu Ser Tyr Phe Lys Ser  
                                     130                                    135                                    140

Asn Lys Ile Asn Pro Gln Ile His Pro His Met Ile Leu Lys Ser Leu  
                                     145                                    150                                    155                                    160

Phe Ile Leu Gly Gly Tyr Phe Ala Ser Tyr Tyr Leu Ala Phe Phe Trp  
                                     165                                    170                                    175

Ser Ser Ser Val Leu Val Ser Leu Phe Phe Ala Leu Trp Met Gly Phe  
                                     180                                    185                                    190

Phe Ala Ala Glu Val Gly Val Ser Ile Gln His Asp Gly Asn His Gly  
                                     195                                    200                                    205

Ser Tyr Thr Lys Trp Arg Gly Phe Gly Tyr Ile Met Gly Ala Ser Leu  
                                     210                                    215                                    220

Asp Leu Val Gly Ala Ser Ser Phe Met Trp Arg Gln Gln His Val Val  
                                     225                                    230                                    235                                    240

Gly His His Ser Phe Thr Asn Val Asp Asn Tyr Asp Pro Asp Ile Arg  
                                     245                                    250                                    255

Val Lys Asp Pro Asp Val Arg Arg Val Ala Thr Thr Gln Pro Arg Gln  
                                     260                                    265                                    270

Trp Tyr His Ala Tyr Gln His Ile Tyr Leu Ala Val Leu Tyr Gly Thr  
                                     275                                    280                                    285

Leu Ala Leu Lys Ser Ile Phe Leu Asp Asp Phe Leu Ala Tyr Phe Thr  
                                     290                                    295                                    300

Gly Ser Ile Gly Pro Val Lys Val Ala Lys Met Thr Pro Leu Glu Phe  
                                     305                                    310                                    315                                    320

Asn Ile Phe Phe Gln Gly Lys Leu Leu Tyr Ala Phe Tyr Met Phe Val  
                                     325                                    330                                    335

Leu Pro Ser Val Tyr Gly Val His Ser Gly Gly Thr Phe Leu Ala Leu  
                                     340                                    345                                    350

Tyr Val Ala Ser Gln Leu Ile Thr Gly Trp Met Leu Ala Phe Leu Phe  
 355 360 365

Gln Val Ala His Val Val Asp Asp Val Ala Phe Pro Thr Pro Glu Gly  
 370 375 380

Gly Lys Val Lys Gly Gly Trp Ala Ala Met Gln Val Ala Thr Thr Thr  
 385 390 395 400

Asp Phe Ser Pro Arg Ser Trp Phe Trp Gly His Val Ser Gly Gly Leu  
 405 410 415

Asn Asn Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Gly Val Cys His Val His  
 420 425 430

Tyr Pro Ala Ile Gln Pro Ile Val Glu Lys Thr Cys Lys Glu Phe Asp  
 435 440 445

Val Pro Tyr Val Ala Tyr Pro Thr Phe Trp Thr Ala Leu Arg Ala His  
 450 455 460

Phe Ala His Leu Lys Lys Val Gly Leu Thr Glu Phe Arg Leu Asp Gly  
 465 470 475 480

<210> 11

<211> 1320

<212> DNA

<213> Thraustrochytrium

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1320)

<223>

<400> 11

atg ggc aag ggc agc gag ggc cgc agc gcg gcg cgc gag atg acg gcc 48  
 Met Gly Lys Gly Ser Glu Gly Arg Ser Ala Ala Arg Glu Met Thr Ala  
 1 5 10 15

gag gcg aac ggc gac aag cgg aaa acg att ctg atc gag ggc gtc ctg 96  
 Glu Ala Asn Gly Asp Lys Arg Lys Thr Ile Leu Ile Glu Gly Val Leu  
 20 25 30

tac gac gcg acg aac ttt aag cac ccg ggc ggt tcg atc atc aac ttc 144  
 Tyr Asp Ala Thr Asn Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Ile Ile Asn Phe  
 35 40 45

ttg acc gag ggc gag gcc ggc gtg gac gcg acg cag gcg tac cgc gag 192  
 Leu Thr Glu Gly Glu Ala Gly Val Asp Ala Thr Gln Ala Tyr Arg Glu

50	55	60	
ttt cat cag cgg tcc ggc aag gcc gac aag tac ctc aag tcg ctg ccg Phe His Gln Arg Ser Gly Lys Ala Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Leu Pro 65 70 75 80			240
aag ctg gat gcg tcc aag gtg gag tcg cgg ttc tcg gcc aaa gag cag Lys Leu Asp Ala Ser Lys Val Glu Ser Arg Phe Ser Ala Lys Glu Gln 85 90 95			288
gcg cgg cgc gac gcc atg acg cgc gac tac gcg gcc ttt cgc gag gag Ala Arg Arg Asp Ala Met Thr Arg Asp Tyr Ala Ala Phe Arg Glu Glu 100 105 110			336
ctc gtc gcc gag ggg tac ttt gac ccg tcg atc ccg cac atg att tac Leu Val Ala Glu Gly Tyr Phe Asp Pro Ser Ile Pro His Met Ile Tyr 115 120 125			384
cgc gtc gtg gag atc gtg gcg ctc ttc gcg ctc tcg ttc tgg ctc atg Arg Val Val Glu Ile Val Ala Leu Phe Ala Leu Ser Phe Trp Leu Met 130 135 140			432
tcc aag gcc tcg ccc acc tcg ctc gtg ctg ggc gtg gtg atg aac ggc Ser Lys Ala Ser Pro Thr Ser Leu Val Leu Gly Val Val Met Asn Gly 145 150 155 160			480
att gcg cag ggc cgc tgc ggc tgg gtc atg cac gag atg ggc cac ggg Ile Ala Gln Gly Arg Cys Gly Trp Val Met His Glu Met Gly His Gly 165 170 175			528
tcg ttc acg ggc gtc atc tgg ctc gac gac cgg atg tgc gag ttc ttc Ser Phe Thr Gly Val Ile Trp Leu Asp Arg Met Cys Glu Phe Phe 180 185 190			576
tac ggc gtc ggc tgc ggc atg agc ggg cac tac tgg aag aac cag cac Tyr Gly Val Gly Cys Gly Met Ser Gly His Tyr Trp Lys Asn Gln His 195 200 205			624
agc aag cac cac gcc gcg ccc aac cgc ctc gag cac gat gtc gat ctc Ser Lys His His Ala Ala Pro Asn Arg Leu Glu His Asp Val Asp Leu 210 215 220			672
aac acg ctg ccc ctg gtc gcc ttt aac gag cgc gtc gtg cgc aag gtc Asn Thr Leu Pro Leu Val Ala Phe Asn Glu Arg Val Val Arg Lys Val 225 230 235 240			720
aag ccg gga tcg ctg ctg gcg ctc tgg ctg cgc gtg cag gcg tac ctc Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ala Leu Trp Leu Arg Val Gln Ala Tyr Leu 245 250 255			768
ttt gcg ccc gtc tcg tgc ctg ctc atc ggc ctt ggc tgg acg ctc tac Phe Ala Pro Val Ser Cys Leu Leu Ile Gly Leu Gly Trp Thr Leu Tyr 260 265 270			816
ctg cac ccg cgc tac atg ctg cgc acc aag cgg cac atg gag ttc gtc Leu His Pro Arg Tyr Met Leu Arg Thr Lys Arg His Met Glu Phe Val 275 280 285			864
tgg atc ttc gcg cgc tac att ggc tgg ttc tcg ctc atg ggc gct ctc Trp Ile Phe Ala Arg Tyr Ile Gly Trp Phe Ser Leu Met Gly Ala Leu 290 295 300			912
ggc tac tcg ccg ggc acc tcg gtc ggg atg tac ctg tgc tcg ttc ggc Gly Tyr Ser Pro Gly Thr Ser Val Gly Met Tyr Leu Cys Ser Phe Gly 305 310 315 320			960
ctc ggc tgc att tac att ttc ctg cag ttc gcc gtc agc cac acg cac Leu Gly Cys Ile Tyr Ile Phe Leu Gln Phe Ala Val Ser His Thr His			1008

## 21

325	330	335	
ctg ccg gtg acc aac ccg gag gac cag ctg cac tgg ctc gag tac gcg Leu Pro Val Thr Asn Pro Glu Asp Gln Leu His Trp Leu Glu Tyr Ala 340 345 350			1056
gcc gac cac acg gtg aac att agc acc aag tcc tgg ctc gtc acg tgg Ala Asp His Thr Val Asn Ile Ser Thr Lys Ser Trp Leu Val Thr Trp 355 360 365			1104
tgg atg tcg aac ctg aac ttt cag atc gag cac cac ctc ttc ccc acg Trp Met Ser Asn Leu Asn Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr 370 375 380			1152
gcg ccg cag ttc cgc ttc aag gaa atc agt cct cgc gtc gag gcc ctc Ala Pro Gln Phe Arg Phe Lys Glu Ile Ser Pro Arg Val Glu Ala Leu 385 390 395 400			1200
ttc aag cgc cac aac ctc ccg tac tac gac ctg ccc tac acg agc gcg Phe Lys Arg His Asn Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Pro Tyr Thr Ser Ala 405 410 415			1248
gtc tcg acc acc ttt gcc aat ctt tat tcc gtc ggc cac tcg gtc ggc Val Ser Thr Thr Phe Ala Asn Leu Tyr Ser Val Gly His Ser Val Gly 420 425 430			1296
gcc gac acc aag aag cag gac tga Ala Asp Thr Lys Lys Gln Asp 435			1320

&lt;210&gt; 12

&lt;211&gt; 439

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Thraustrochytrium

&lt;400&gt; 12

Met Gly Lys Gly Ser Glu Gly Arg Ser Ala Ala Arg Glu Met Thr Ala
1 5 10 15

Glu Ala Asn Gly Asp Lys Arg Lys Thr Ile Leu Ile Glu Gly Val Leu
20 25 30

Tyr Asp Ala Thr Asn Phe Lys His Pro Gly Gly Ser Ile Ile Asn Phe
35 40 45

Leu Thr Glu Gly Glu Ala Gly Val Asp Ala Thr Gln Ala Tyr Arg Glu
50 55 60

Phe His Gln Arg Ser Gly Lys Ala Asp Lys Tyr Leu Lys Ser Leu Pro
65 70 75 80

Lys Leu Asp Ala Ser Lys Val Glu Ser Arg Phe Ser Ala Lys Glu Gln
85 90 95

Ala Arg Arg Asp Ala Met Thr Arg Asp Tyr Ala Ala Phe Arg Glu Glu

100	105	110
Leu Val Ala Glu Gly Tyr Phe Asp Pro Ser Ile Pro His Met Ile Tyr		
115	120	125
Arg Val Val Glu Ile Val Ala Leu Phe Ala Leu Ser Phe Trp Leu Met		
130	135	140
Ser Lys Ala Ser Pro Thr Ser Leu Val Leu Gly Val Val Met Asn Gly		
145	150	155
Ile Ala Gln Gly Arg Cys Gly Trp Val Met His Glu Met Gly His Gly		
165	170	175
Ser Phe Thr Gly Val Ile Trp Leu Asp Asp Arg Met Cys Glu Phe Phe		
180	185	190
Tyr Gly Val Gly Cys Gly Met Ser Gly His Tyr Trp Lys Asn Gln His		
195	200	205
Ser Lys His His Ala Ala Pro Asn Arg Leu Glu His Asp Val Asp Leu		
210	215	220
Asn Thr Leu Pro Leu Val Ala Phe Asn Glu Arg Val Val Arg Lys Val		
225	230	235
Lys Pro Gly Ser Leu Leu Ala Leu Trp Leu Arg Val Gln Ala Tyr Leu		
245	250	255
Phe Ala Pro Val Ser Cys Leu Leu Ile Gly Leu Gly Trp Thr Leu Tyr		
260	265	270
Leu His Pro Arg Tyr Met Leu Arg Thr Lys Arg His Met Glu Phe Val		
275	280	285
Trp Ile Phe Ala Arg Tyr Ile Gly Trp Phe Ser Leu Met Gly Ala Leu		
290	295	300
Gly Tyr Ser Pro Gly Thr Ser Val Gly Met Tyr Leu Cys Ser Phe Gly		
305	310	315
Leu Gly Cys Ile Tyr Ile Phe Leu Gln Phe Ala Val Ser His Thr His		
325	330	335
Leu Pro Val Thr Asn Pro Glu Asp Gln Leu His Trp Leu Glu Tyr Ala		
340	345	350
Ala Asp His Thr Val Asn Ile Ser Thr Lys Ser Trp Leu Val Thr Trp		
355	360	365
Trp Met Ser Asn Leu Asn Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr		

370 375 380

Ala Pro Gln Phe Arg Phe Lys Glu Ile Ser Pro Arg Val Glu Ala Leu  
385 390 395 400

Phe Lys Arg His Asn Leu Pro Tyr Tyr Asp Leu Pro Tyr Thr Ser Ala  
405 410 415

Val Ser Thr Thr Phe Ala Asn Leu Tyr Ser Val Gly His Ser Val Gly  
420 425 430

Ala Asp Thr Lys Lys Gln Asp  
435

<210> 13

<211> 1341

<212> DNA

<213> Mortierella alpina

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (1341)

<223> Delta-5-Desaturase

<400> 13

atg gga acg gac caa gga aaa acc ttc acc tgg gaa gag ctg gcg gcc	48
Met Gly Thr Asp Gln Gly Lys Thr Phe Thr Trp Glu Glu Leu Ala Ala	
1 5 10 15	
cat aac acc aag gac gac cta ctc ttg gcc atc cgc ggc agg gtg tac	96
His Asn Thr Lys Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ile Arg Gly Arg Val Tyr	
20 25 30	
gat gtc aca aag ttc ttg agc cgc cat cct ggt gga gtg gac act ctc	144
Asp Val Thr Lys Phe Leu Ser Arg His Pro Gly Gly Val Asp Thr Leu	
35 40 45	
ctg ctc gga gct ggc cga gat gtt act ccg gtc ttt gag atg tat cac	192
Leu Leu Gly Ala Gly Arg Asp Val Thr Pro Val Phe Glu Met Tyr His	
50 55 60	
gcg ttt ggg gct gca gat gcc att atg aag aag tac tat gtc ggt aca	240
Ala Phe Gly Ala Ala Asp Ala Ile Met Lys Lys Tyr Tyr Val Gly Thr	
65 70 75 80	
ctg gtc tcg aat gag ctg ccc atc ttc ccg gag cca acg gtg ttc cac	288
Leu Val Ser Asn Glu Leu Pro Ile Phe Pro Glu Pro Thr Val Phe His	
85 90 95	
aaa acc atc aag acg aga gtc gag ggc tac ttt acg gat cgg aac att	336
Lys Thr Ile Lys Thr Arg Val Glu Gly Tyr Phe Thr Asp Arg Asn Ile	
100 105 110	

## 24

gat ccc aag aat aga cca gag atc tgg gga cga tac gct ctt atc ttt Asp Pro Lys Asn Arg Pro Glu Ile Trp Gly Arg Tyr Ala Leu Ile Phe 115 120 125	384
gga tcc ttg atc gct tcc tac tac gcg cag ctc ttt gtg cct ttc gtt Gly Ser Leu Ile Ala Ser Tyr Tyr Ala Gln Leu Phe Val Pro Phe Val 130 135 140	432
gtc gaa cgc aca tgg ctt cag gtg gtg ttt gca atc atc atg gga ttt Val Glu Arg Thr Trp Leu Gln Val Val Phe Ala Ile Ile Met Gly Phe 145 150 155 160	480
gcg tgc gca caa gtc gga ctc aac cct ctt cat gat gcg tct cac ttt Ala Cys Ala Gln Val Gly Leu Asn Pro Leu His Asp Ala Ser His Phe 165 170 175	528
tca gtg acc cac aac ccc act gtc tgg aag att ctg gga gcc acg cac Ser Val Thr His Asn Pro Thr Val Trp Lys Ile Leu Gly Ala Thr His 180 185 190	576
gac ttt ttc aac gga gca tcg tac ctg gtg tgg atg tac caa cat atg Asp Phe Phe Asn Gly Ala Ser Tyr Leu Val Trp Met Tyr Gln His Met 195 200 205	624
ctc ggc cat cac ccc tac acc aac att gct gga gca gat ccc gac gtg Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Ile Ala Gly Ala Asp Pro Asp Val 210 215 220	672
tcg acg tct gag ccc gat gtt cgt cgt atc aag ccc aac caa aag tgg Ser Thr Ser Glu Pro Asp Val Arg Arg Ile Lys Pro Asn Gln Lys Trp 225 230 235 240	720
ttt gtc aac cac atc aac cag cac atg ttt gtt cct ttc ctg tac gga Phe Val Asn His Ile Asn Gln His Met Phe Val Pro Phe Leu Tyr Gly 245 250 255	768
ctg ctg gcg ttc aag gtg cgc att cag gac atc aac att ttg tac ttt Leu Leu Ala Phe Lys Val Arg Ile Gln Asp Ile Asn Ile Leu Tyr Phe 260 265 270	816
gtc aag acc aat gac gct att cgt gtc aat ccc atc tcg aca tgg cac Val Lys Thr Asn Asp Ala Ile Arg Val Asn Pro Ile Ser Thr Trp His 275 280 285	864
act gtg atg ttc tgg ggc ggc aag gct ttc ttt gtc tgg tat cgc ctg Thr Val Met Phe Trp Gly Gly Lys Ala Phe Phe Val Trp Tyr Arg Leu 290 295 300	912
att gtt ccc ctg cag tat ctg ccc ctg ggc aag gtg ctg ctc ttg ttc Ile Val Pro Leu Gln Tyr Leu Pro Leu Gly Lys Val Leu Leu Leu Phe 305 310 315 320	960
acg gtc gcg gac atg gtg tcg tct tac tgg ctg gcg ctg acc ttc cag Thr Val Ala Asp Met Val Ser Ser Tyr Trp Leu Ala Leu Thr Phe Gln 325 330 335	1008
gcg aac cac gtt gtt gag gaa gtt cag tgg ccg ttg cct gac gag aac Ala Asn His Val Val Glu Glu Val Gln Trp Pro Leu Pro Asp Glu Asn 340 345 350	1056
ggg atc atc caa aag gac tgg gca gct atg cag gtc gag act acg cag Gly Ile Ile Gln Lys Asp Trp Ala Ala Met Gln Val Glu Thr Thr Gln 355 360 365	1104
gat tac gca cac gat tcg cac ctc tgg acc agc atc act ggc agc ttg Asp Tyr Ala His Asp Ser His Leu Trp Thr Ser Ile Thr Gly Ser Leu 370 375 380	1152

## 25

aac tac cag gct gtg cac cat ctg ttc ccc aac gtg tcg cag cac cat 1200  
 Asn Tyr Gln Ala Val His His Leu Phe Pro Asn Val Ser Gln His His  
 385 390 395 400  
 tat ccc gat att ctg gcc atc atc aag aac acc tgc agc gag tac aag 1248  
 Tyr Pro Asp Ile Leu Ala Ile Ile Lys Asn Thr Cys Ser Glu Tyr Lys  
 405 410 415  
 gtt cca tac ctt gtc aag gat acg ttt tgg caa gca ttt gct tca cat 1296  
 Val Pro Tyr Leu Val Lys Asp Thr Phe Trp Gln Ala Phe Ala Ser His  
 420 425 430  
 ttg gag cac ttg cgt gtt ctt gga ctc cgt ccc aag gaa gag tag 1341  
 Leu Glu His Leu Arg Val Leu Gly Leu Arg Pro Lys Glu Glu  
 435 440 445

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; PRT

<213> *Mortierella alpina*

&lt;400&gt; 14

Met Gly Thr Asp Gln Gly Lys Thr Phe Thr Trp Glu Glu Leu Ala Ala  
 1 5 10 15

His Asn Thr Lys Asp Asp Leu Leu Leu Ala Ile Arg Gly Arg Val Tyr  
 20 25 30

Asp Val Thr Lys Phe Leu Ser Arg His Pro Gly Gly Val Asp Thr Leu  
 35 40 45

Leu Leu Gly Ala Gly Arg Asp Val Thr Pro Val Phe Glu Met Tyr His  
 50 55 60

Ala Phe Gly Ala Ala Asp Ala Ile Met Lys Lys Tyr Tyr Val Gly Thr  
 65 70 75 80

Leu Val Ser Asn Glu Leu Pro Ile Phe Pro Glu Pro Thr Val Phe His  
 85 90 95

Lys Thr Ile Lys Thr Arg Val Glu Gly Tyr Phe Thr Asp Arg Asn Ile  
 100 105 110

Asp Pro Lys Asn Arg Pro Glu Ile Trp Gly Arg Tyr Ala Leu Ile Phe  
 115 120 125

Gly Ser Leu Ile Ala Ser Tyr Tyr Ala Gln Leu Phe Val Pro Phe Val  
 130 135 140

Val Glu Arg Thr Trp Leu Gln Val Val Phe Ala Ile Ile Met Gly Phe  
 145 150 155 160



Ala Cys Ala Gln Val Gly Leu Asn Pro Leu His Asp Ala Ser His Phe  
 165 170 175

Ser Val Thr His Asn Pro Thr Val Trp Lys Ile Leu Gly Ala Thr His  
 180 185 190

Asp Phe Phe Asn Gly Ala Ser Tyr Leu Val Trp Met Tyr Gln His Met  
 195 200 205

Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Ile Ala Gly Ala Asp Pro Asp Val  
 210 215 220

Ser Thr Ser Glu Pro Asp Val Arg Arg Ile Lys Pro Asn Gln Lys Trp  
 225 230 235 240

Phe Val Asn His Ile Asn Gln His Met Phe Val Pro Phe Leu Tyr Gly  
 245 250 255

Leu Leu Ala Phe Lys Val Arg Ile Gln Asp Ile Asn Ile Leu Tyr Phe  
 260 265 270

Val Lys Thr Asn Asp Ala Ile Arg Val Asn Pro Ile Ser Thr Trp His  
 275 280 285

Thr Val Met Phe Trp Gly Gly Lys Ala Phe Phe Val Trp Tyr Arg Leu  
 290 295 300

Ile Val Pro Leu Gln Tyr Leu Pro Leu Gly Lys Val Leu Leu Leu Phe  
 305 310 315 320

Thr Val Ala Asp Met Val Ser Ser Tyr Trp Leu Ala Leu Thr Phe Gln  
 325 330 335

Ala Asn His Val Val Glu Glu Val Gln Trp Pro Leu Pro Asp Glu Asn  
 340 345 350

Gly Ile Ile Gln Lys Asp Trp Ala Ala Met Gln Val Glu Thr Thr Gln  
 355 360 365

Asp Tyr Ala His Asp Ser His Leu Trp Thr Ser Ile Thr Gly Ser Leu  
 370 375 380

Asn Tyr Gln Ala Val His His Leu Phe Pro Asn Val Ser Gln His His  
 385 390 395 400

Tyr Pro Asp Ile Leu Ala Ile Ile Lys Asn Thr Cys Ser Glu Tyr Lys  
 405 410 415

Val Pro Tyr Leu Val Lys Asp Thr Phe Trp Gln Ala Phe Ala Ser His  
 420 425 430

Leu Glu His Leu Arg Val Leu Gly Leu Arg Pro Lys Glu Glu  
 435 440 445

<210> 15

<211> 1344

<212> DNA

<213> *Caenorhabditis elegans*

<220> .

<221> CDS

<222> (1)..(1344)

<223> Delta-5-Desaturase

<400> 15  
 atg gta tta cga gag caa gag cat gag cca ttc ttc att aaa att gat 48  
 Met Val Leu Arg Glu Gln Glu His Glu Pro Phe Phe Ile Lys Ile Asp  
 1 5 10 15

gga aaa tgg tgt caa att gac gat gct gtc ctg aga tca cat cca ggt 96  
 Gly Lys Trp Cys Gln Ile Asp Asp Ala Val Leu Arg Ser His Pro Gly  
 20 25 30

ggt agt gca att act acc tat aaa aat atg gat gcc act acc gta ttc 144  
 Gly Ser Ala Ile Thr Thr Tyr Lys Asn Met Asp Ala Thr Thr Val Phe  
 35 40 45

cac aca ttc cat act ggt tct aaa gaa gcg tat caa tgg ctg aca gaa 192  
 His Thr Phe His Thr Gly Ser Lys Glu Ala Tyr Gln Trp Leu Thr Glu  
 50 55 60

ttg aaa aaa gag tgc cct aca caa gaa cca gag atc cca gat att aag 240  
 Leu Lys Lys Glu Cys Pro Thr Gln Glu Pro Glu Ile Pro Asp Ile Lys  
 65 70 75 80

gat gac cca atc aaa gga att gat gat gtg aac atg gga act ttc aat 288  
 Asp Asp Pro Ile Lys Gly Ile Asp Asp Val Asn Met Gly Thr Phe Asn  
 85 90 95

att tct gag aaa cga tct gcc caa ata aat aaa agt ttc act gat cta 336  
 Ile Ser Glu Lys Arg Ser Ala Gln Ile Asn Lys Ser Phe Thr Asp Leu  
 100 105 110

cgt atg cga gtt cgt gca gaa gga ctt atg gat gga tct cct ttg ttc 384  
 Arg Met Arg Val Arg Ala Glu Gly Leu Met Asp Gly Ser Pro Leu Phe  
 115 120 125

tac att aga aaa att ctt gaa aca atc ttc aca att ctt ttt gca ttc 432  
 Tyr Ile Arg Lys Ile Leu Glu Thr Ile Phe Thr Ile Leu Phe Ala Phe  
 130 135 140

tac ctt caa tac cac aca tat tat ctt cca tca gct att cta atg gga 480  
 Tyr Leu Gln Tyr His Thr Tyr Tyr Leu Pro Ser Ala Ile Leu Met Gly  
 145 150 155 160

gtt gcg tgg caa caa ttg gga tgg tta atc cat gaa ttc gca cat cat 528  
 Val Ala Trp Gln Gln Leu Gly Trp Leu Ile His Glu Phe Ala His His

## 28

165	170	175	
cag ttg ttc aaa aac aga tac tac aat gat ttg gcc agc tat ttc gtt Gln Leu Phe Lys Asn Arg Tyr Tyr Asn Asp Leu Ala Ser Tyr Phe Val 180 185 190			576
gga aac ttt tta caa gga ttc tca tct ggt ggt tgg aaa gag cag cac Gly Asn Phe Leu Gln Gly Phe Ser Ser Gly Gly Trp Lys Glu Gln His 195 200 205			624
aat gtg cat cac gca gcc aca aat gtt gtt gga cga gac gga gat ctt Asn Val His His Ala Ala Thr Asn Val Val Gly Arg Asp Gly Asp Leu 210 215 220			672
gat tta gtc cca ttc tat gct aca gtg gca gaa cat ctc aac aat tat Asp Leu Val Pro Phe Tyr Ala Thr Val Ala Glu His Leu Asn Asn Tyr 225 230 235 240			720
tct cag gat tca tgg gtt atg act cta ttc aga tgg caa cat gtt cat Ser Gln Asp Ser Trp Val Met Thr Leu Phe Arg Trp Gln His Val His 245 250 255			768
tgg aca ttc atg tta cca ttc ctc cgt ctc tcg tgg ctt ctt cag tca Trp Thr Phe Met Leu Pro Phe Leu Arg Leu Ser Trp Leu Leu Gln Ser 260 265 270			816
atc att ttt gtt agt cag atg cca act cat tat tat gac tat tac aga Ile Ile Phe Val Ser Gln Met Pro Thr His Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Arg 275 280 285			864
aat act gcg att tat gaa cag gtt ggt ctc tct ttg cac tgg gct tgg Asn Thr Ala Ile Tyr Glu Gln Val Gly Leu Ser Leu His Trp Ala Trp 290 295 300			912
tca ttg ggt caa ttg tat ttc cta ccc gat tgg tca act aga ata atg Ser Leu Gly Gln Leu Tyr Phe Leu Pro Asp Trp Ser Thr Arg Ile Met 305 310 315 320			960
ttc ttc ctt gtt tct cat ctt gtt gga ggt ttc ctg ctc tct cat gta Phe Phe Leu Val Ser His Leu Val Gly Gly Phe Leu Leu Ser His Val 325 330 335			1008
gtt act ttc aat cat tat tca gtg gag aag ttt gca ttg agc tcg aac Val Thr Phe Asn His Tyr Ser Val Glu Lys Phe Ala Leu Ser Ser Asn 340 345 350			1056
atc atg tca aat tac gct tgt ctt caa atc atg acc aca aga aat atg Ile Met Ser Asn Tyr Ala Cys Leu Gln Ile Met Thr Thr Arg Asn Met 355 360 365			1104
aga cct gga aga ttc att gac tgg ctt tgg gga ggt ctt aac tat cag Arg Pro Gly Arg Phe Ile Asp Trp Leu Trp Gly Gly Leu Asn Tyr Gln 370 375 380			1152
att gag cac cat ctt ttc cca acg atg cca cga cac aac ttg aac act Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Thr 385 390 395 400			1200
gtt atg cca ctt gtt aag gag ttt gca gca gca aat ggt tta cca tac Val Met Pro Leu Val Lys Glu Phe Ala Ala Ala Asn Gly Leu Pro Tyr 405 410 415			1248
atg gtc gac gat tat ttc aca gga ttc tgg ctt gaa att gag caa ttc Met Val Asp Asp Tyr Phe Thr Gly Phe Trp Leu Glu Ile Glu Gln Phe 420 425 430			1296
cga aat att gca aat gtt gct gct aaa ttg act aaa aag att gcc tag Arg Asn Ile Ala Asn Val Ala Ala Lys Leu Thr Lys Lys Ile Ala			1344

435  
 440  
 445

<210> 16  
 <211> 447  
 <212> PRT  
 <213> *Caenorhabditis elegans*

<400> 16  
 Met Val Leu Arg Glu Gln Glu His Glu Pro Phe Phe Ile Lys Ile Asp  
 1 5 10 15  
 Gly Lys Trp Cys Gln Ile Asp Asp Ala Val Leu Arg Ser His Pro Gly  
 20 25 30  
 Gly Ser Ala Ile Thr Thr Tyr Lys Asn Met Asp Ala Thr Thr Val Phe  
 35 40 45  
 His Thr Phe His Thr Gly Ser Lys Glu Ala Tyr Gln Trp Leu Thr Glu  
 50 55 60  
 Leu Lys Lys Glu Cys Pro Thr Gln Glu Pro Glu Ile Pro Asp Ile Lys  
 65 70 75 80  
 Asp Asp Pro Ile Lys Gly Ile Asp Asp Val Asn Met Gly Thr Phe Asn  
 85 90 95  
 Ile Ser Glu Lys Arg Ser Ala Gln Ile Asn Lys Ser Phe Thr Asp Leu  
 100 105 110  
 Arg Met Arg Val Arg Ala Glu Gly Leu Met Asp Gly Ser Pro Leu Phe  
 115 120 125  
 Tyr Ile Arg Lys Ile Leu Glu Thr Ile Phe Thr Ile Leu Phe Ala Phe  
 130 135 140  
 Tyr Leu Gln Tyr His Thr Tyr Tyr Leu Pro Ser Ala Ile Leu Met Gly  
 145 150 155 160  
 Val Ala Trp Gln Gln Leu Gly Trp Leu Ile His Glu Phe Ala His His  
 165 170 175  
 Gln Leu Phe Lys Asn Arg Tyr Tyr Asn Asp Leu Ala Ser Tyr Phe Val  
 180 185 190  
 Gly Asn Phe Leu Gln Gly Phe Ser Ser Gly Gly Trp Lys Glu Gln His  
 195 200 205  
 Asn Val His His Ala Ala Thr Asn Val Val Gly Arg Asp Gly Asp Leu

30

210                                      215                                      220  
 Asp Leu Val Pro Phe Tyr Ala Thr Val Ala Glu His Leu Asn Asn Tyr  
 225                                      230                                      235                                      240  
 Ser Gln Asp Ser Trp Val Met Thr Leu Phe Arg Trp Gln His Val His  
 245                                      250                                      255  
 Trp Thr Phe Met Leu Pro Phe Leu Arg Leu Ser Trp Leu Leu Gln Ser  
 260                                      265                                      270  
 Ile Ile Phe Val Ser Gln Met Pro Thr His Tyr Tyr Asp Tyr Tyr Arg  
 275                                      280                                      285  
 Asn Thr Ala Ile Tyr Glu Gln Val Gly Leu Ser Leu His Trp Ala Trp  
 290                                      295                                      300  
 Ser Leu Gly Gln Leu Tyr Phe Leu Pro Asp Trp Ser Thr Arg Ile Met  
 305                                      310                                      315                                      320  
 Phe Phe Leu Val Ser His Leu Val Gly Gly Phe Leu Leu Ser His Val  
 325                                      330                                      335  
 Val Thr Phe Asn His Tyr Ser Val Glu Lys Phe Ala Leu Ser Ser Asn  
 340                                      345                                      350  
 Ile Met Ser Asn Tyr Ala Cys Leu Gln Ile Met Thr Thr Arg Asn Met  
 355                                      360                                      365  
 Arg Pro Gly Arg Phe Ile Asp Trp Leu Trp Gly Gly Leu Asn Tyr Gln  
 370                                      375                                      380  
 Ile Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Thr  
 385                                      390                                      395                                      400  
 Val Met Pro Leu Val Lys Glu Phe Ala Ala Ala Asn Gly Leu Pro Tyr  
 405                                      410                                      415  
 Met Val Asp Asp Tyr Phe Thr Gly Phe Trp Leu Glu Ile Glu Gln Phe  
 420                                      425                                      430  
 Arg Asn Ile Ala Asn Val Ala Ala Lys Leu Thr Lys Lys Ile Ala  
 435                                      440                                      445

&lt;210&gt; 17

&lt;211&gt; 1683

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Borago officinalis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (42)..(1388)

&lt;223&gt; Delta-6-Desaturase

&lt;400&gt; 17

tatctgccta ccctcccaaa gagagtagtc atttttcatc a atg gct gct caa atc	56
Met Ala Ala Gln Ile	
1 5	
aag aaa tac att acc tca gat gaa ctc aag aac cac gat aaa ccc gga	104
Lys Lys Tyr Ile Thr Ser Asp Glu Leu Lys Asn His Asp Lys Pro Gly	
10 15 20	
gat cta tgg atc tcg att caa ggg aaa gcc tat gat gtt tcg gat tgg	152
Asp Leu Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Ala Tyr Asp Val Ser Asp Trp	
25 30 35	
gtg aaa gac cat cca ggt ggc agc ttt ccc ttg aag agt ctt gct ggt	200
Val Lys Asp His Pro Gly Gly Ser Phe Pro Leu Lys Ser Leu Ala Gly	
40 45 50	
caa gag gta act gat gca ttt gtt gca ttc cat cct gcc tct aca tgg	248
Gln Glu Val Thr Asp Ala Phe Val Ala Phe His Pro Ala Ser Thr Trp	
55 60 65	
aag aat ctt gat aag ttt ttc act ggg tat tat ctt aaa gat tac tct	296
Lys Asn Leu Asp Lys Phe Phe Thr Gly Tyr Leu Lys Asp Tyr Ser	
70 75 80 85	
gtt tct gag gtt tct aaa gat tat agg aag ctt gtg ttt gag ttt tct	344
Val Ser Glu Val Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Leu Val Phe Glu Phe Ser	
90 95 100	
aaa atg ggt ttg tat gac aaa aaa ggt cat att atg ttt gca act ttg	392
Lys Met Gly Leu Tyr Asp Lys Lys Gly His Ile Met Phe Ala Thr Leu	
105 110 115	
tgc ttt ata gca atg ctg ttt gct atg agt gtt tat ggg gtt ttg ttt	440
Cys Phe Ile Ala Met Leu Phe Ala Met Ser Val Tyr Gly Val Leu Phe	
120 125 130	
tgt gag ggt gtt ttg gta cat ttg ttt tct ggg tgt ttg atg ggg ttt	488
Cys Glu Gly Val Leu Val His Leu Phe Ser Gly Cys Leu Met Gly Phe	
135 140 145	
ctt tgg att cag agt ggt tgg att gga cat gat gct ggg cat tat atg	536
Leu Trp Ile Gln Ser Gly Trp Ile Gly His Asp Ala Gly His Tyr Met	
150 155 160 165	
gta gtg tct gat tca agg ctt aat aag ttt atg ggt att ttt gct gca	584
Val Val Ser Asp Ser Arg Leu Asn Lys Phe Met Gly Ile Phe Ala Ala	
170 175 180	
aat tgt ctt tca gga ata agt att ggt tgg tgg aaa tgg aac cat aat	632
Asn Cys Leu Ser Gly Ile Ser Ile Gly Trp Trp Lys Trp Asn His Asn	
185 190 195	
gca cat cac att gcc tgt aat agc ctt gaa tat gac cct gat tta caa	680
Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Glu Tyr Asp Pro Asp Leu Gln	
200 205 210	

tat ata cca ttc ctt gtt gtg tct tcc aag ttt ttt ggt tca ctc acc Tyr Ile Pro Phe Leu Val Val Ser Ser Lys Phe Phe Gly Ser Leu Thr 215 220 225	728
tct cat ttc tat gag aaa agg ttg act ttt gac tct tta tca aga ttc Ser His Phe Tyr Glu Lys Arg Leu Thr Phe Asp Ser Leu Ser Arg Phe 230 235 240 245	776
ttt gta agt tat caa cat tgg aca ttt tac cct att atg tgt gct gct Phe Val Ser Tyr Gln His Trp Thr Phe Tyr Pro Ile Met Cys Ala Ala 250 255 260	824
agg ctc aat atg tat gta caa tct ctc ata atg ttg ttg acc aag aga Arg Leu Asn Met Tyr Val Gln Ser Leu Ile Met Leu Leu Thr Lys Arg 265 270 275	872
aat gtg tcc tat cga gct cag gaa ctc ttg gga tgc cta gtg ttc tcg Asn Val Ser Tyr Arg Ala Gln Glu Leu Leu Gly Cys Leu Val Phe Ser 280 285 290	920
att tgg tac ccg ttg ctt gtt tct tgt ttg cct aat tgg ggt gaa aga Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Val Ser Cys Leu Pro Asn Trp Gly Glu Arg 295 300 305	968
att atg ttt gtt att gca agt tta tca gtg act gga atg caa caa gtt Ile Met Phe Val Ile Ala Ser Leu Ser Val Thr Gly Met Gln Gln Val 310 315 320 325	1016
cag ttc tcc ttg aac cac ttc tct tca agt gtt tat gtt gga aag cct Gln Phe Ser Leu Asn His Phe Ser Ser Ser Val Tyr Val Gly Lys Pro 330 335 340	1064
aaa ggg aat aat tgg ttt gag aaa caa acg gat ggg aca ctt gac att Lys Gly Asn Asn Trp Phe Glu Lys Gln Thr Asp Gly Thr Leu Asp Ile 345 350 355	1112
tct tgt cct cct tgg atg gat tgg ttt cat ggt gga ttg caa ttc caa Ser Cys Pro Pro Trp Met Asp Trp Phe His Gly Gly Leu Gln Phe Gln 360 365 370	1160
att gag cat cat ttg ttt ccc aag atg cct aga tgc aac ctt agg aaa Ile Glu His His Leu Phe Pro Lys Met Pro Arg Cys Asn Leu Arg Lys 375 380 385	1208
atc tcg ccc tac gtg atc gag tta tgc aag aaa cat aat ttg cct tac Ile Ser Pro Tyr Val Ile Glu Leu Cys Lys Lys His Asn Leu Pro Tyr 390 395 400 405	1256
aat tat gca tct ttc tcc aag gcc aat gaa atg aca ctc aga aca ttg Asn Tyr Ala Ser Phe Ser Lys Ala Asn Glu Met Thr Leu Arg Thr Leu 410 415 420	1304
agg aac aca gca ttg cag gct agg gat ata acc aag ccg ctc ccg aag Arg Asn Thr Ala Leu Gln Ala Arg Asp Ile Thr Lys Pro Leu Pro Lys 425 430 435	1352
aat ttg gta tgg gaa gct ctt cac act cat ggt taa aattaccctt Asn Leu Val Trp Glu Ala Leu His Thr His Gly 440 445	1398
agttcatgta ataatttgag attatgtatc tccatgttt gtgtcttgtc ttggttctac	1458
ttgttggagt cattgcaact tgtcttttat ggtttattag atgtttttta atatatttta	1518
gaggttttgc tttcatctcc attattgatg aataaggagt tgcattattgt caattgttgt	1578
gctcaatatc tgatattttg gaatgtactt tgtaccactg tgttttcagt tgaagctcat	1638

gtgtactttct atagacttttg tttaaatggt tatgtcatgt tattt

1683

<210> 18

<211> 448

<212> PRT

<213> Borago officinalis

<400> 18

Met Ala Ala Gln Ile Lys Lys Tyr Ile Thr Ser Asp Glu Leu Lys Asn  
1 5 10 15

His Asp Lys Pro Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile Gln Gly Lys Ala Tyr  
20 25 30

Asp Val Ser Asp Trp Val Lys Asp His Pro Gly Gly Ser Phe Pro Leu  
35 40 45

Lys Ser Leu Ala Gly Gln Glu Val Thr Asp Ala Phe Val Ala Phe His  
50 55 60

Pro Ala Ser Thr Trp Lys Asn Leu Asp Lys Phe Phe Thr Gly Tyr Tyr  
65 70 75 80

Leu Lys Asp Tyr Ser Val Ser Glu Val Ser Lys Asp Tyr Arg Lys Leu  
85 90 95

Val Phe Glu Phe Ser Lys Met Gly Leu Tyr Asp Lys Lys Gly His Ile  
100 105 110

Met Phe Ala Thr Leu Cys Phe Ile Ala Met Leu Phe Ala Met Ser Val  
115 120 125

Tyr Gly Val Leu Phe Cys Glu Gly Val Leu Val His Leu Phe Ser Gly  
130 135 140

Cys Leu Met Gly Phe Leu Trp Ile Gln Ser Gly Trp Ile Gly His Asp  
145 150 155 160

Ala Gly His Tyr Met Val Val Ser Asp Ser Arg Leu Asn Lys Phe Met  
165 170 175

Gly Ile Phe Ala Ala Asn Cys Leu Ser Gly Ile Ser Ile Gly Trp Trp  
180 185 190

Lys Trp Asn His Asn Ala His His Ile Ala Cys Asn Ser Leu Glu Tyr  
195 200 205



## 34

Asp Pro Asp Leu Gln Tyr Ile Pro Phe Leu Val Val Ser Ser Lys Phe  
 210 215 220

Phe Gly Ser Leu Thr Ser His Phe Tyr Glu Lys Arg Leu Thr Phe Asp  
 225 230 235 240

Ser Leu Ser Arg Phe Phe Val Ser Tyr Gln His Trp Thr Phe Tyr Pro  
 245 250 255

Ile Met Cys Ala Ala Arg Leu Asn Met Tyr Val Gln Ser Leu Ile Met  
 260 265 270

Leu Leu Thr Lys Arg Asn Val Ser Tyr Arg Ala Gln Glu Leu Leu Gly  
 275 280 285

Cys Leu Val Phe Ser Ile Trp Tyr Pro Leu Leu Val Ser Cys Leu Pro  
 290 295 300

Asn Trp Gly Glu Arg Ile Met Phe Val Ile Ala Ser Leu Ser Val Thr  
 305 310 315 320

Gly Met Gln Gln Val Gln Phe Ser Leu Asn His Phe Ser Ser Ser Val  
 325 330 335

Tyr Val Gly Lys Pro Lys Gly Asn Asn Trp Phe Glu Lys Gln Thr Asp  
 340 345 350

Gly Thr Leu Asp Ile Ser Cys Pro Pro Trp Met Asp Trp Phe His Gly  
 355 360 365

Gly Leu Gln Phe Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro Lys Met Pro Arg  
 370 375 380

Cys Asn Leu Arg Lys Ile Ser Pro Tyr Val Ile Glu Leu Cys Lys Lys  
 385 390 395 400

His Asn Leu Pro Tyr Asn Tyr Ala Ser Phe Ser Lys Ala Asn Glu Met  
 405 410 415

Thr Leu Arg Thr Leu Arg Asn Thr Ala Leu Gln Ala Arg Asp Ile Thr  
 420 425 430

Lys Pro Leu Pro Lys Asn Leu Val Trp Glu Ala Leu His Thr His Gly  
 435 440 445

<210> 19

<211> 1563

<212> DNA

<213> Ceratodon purpureus

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1563)

&lt;223&gt; Delta-6-Desaturase

&lt;400&gt; 19

atg gtg tcc cag ggc ggc ggt ctc tcg cag ggt tcc att gaa gaa aac	48
Met Val Ser Gln Gly Gly Leu Ser Gln Gly Ser Ile Glu Glu Asn	
1 5 10 15	
att gac gtt gag cac ttg gca acg atg ccc ctc gtc agt gac ttc cta	96
Ile Asp Val His Leu Ala Thr Met Pro Leu Val Ser Asp Phe Leu	
20 25 30	
aat gtc ctg gga acg act ttg ggc cag tgg agt ctt tcc act aca ttc	144
Asn Val Leu Gly Thr Thr Leu Gly Gln Trp Ser Leu Ser Thr Thr Phe	
35 40 45	
gct ttc aag agg ctc acg act aag aaa cac agt tcg gac atc tcg gtg	192
Ala Phe Lys Arg Leu Thr Lys Lys His Ser Ser Asp Ile Ser Val	
50 55 60	
gag gca caa aaa gaa tcg gtt gcg cgg ggg cca gtt gag aat att tct	240
Glu Ala Gln Lys Glu Ser Val Ala Arg Gly Pro Val Glu Asn Ile Ser	
65 70 75 80	
caa tcg gtt gcg cag ccc atc agg cgg agg tgg gtg cag gat aaa aag	288
Gln Ser Val Ala Gln Pro Ile Arg Arg Arg Trp Val Gln Asp Lys Lys	
85 90 95	
ccg gtt act tac agc ctg aag gat gta gct tcg cac gat atg ccc cag	336
Pro Val Thr Tyr Ser Leu Lys Asp Val Ala Ser His Asp Met Pro Gln	
100 105 110	
gac tgc tgg att ata atc aaa gag aag gtg tat gat gtg agc acc ttc	384
Asp Cys Trp Ile Ile Ile Lys Glu Lys Val Tyr Asp Val Ser Thr Phe	
115 120 125	
gct gag cag cac cct gga ggc acg gtt atc aac acc tac ttc gga cga	432
Ala Glu Gln His Pro Gly Gly Thr Val Ile Asn Thr Tyr Phe Gly Arg	
130 135 140	
gac gcc aca gat gtt ttc tct act ttc cac gca tcc acc tca tgg aag	480
Asp Ala Thr Asp Val Phe Ser Thr Phe His Ala Ser Thr Ser Trp Lys	
145 150 155 160	
att ctt cag aat ttc tac atc ggg aac ctt gtt agg gag gag ccg act	528
Ile Leu Gln Asn Phe Tyr Ile Gly Asn Leu Val Arg Glu Glu Pro Thr	
165 170 175	
ttg gag ctg ctg aag gag tac aga gag ttg aga gcc ctt ttc ttg aga	576
Leu Glu Leu Leu Lys Glu Tyr Arg Glu Leu Arg Ala Leu Phe Leu Arg	
180 185 190	
gaa cag ctt ttc aag agt tcc aaa tcc tac tac ctt ttc aag act ctc	624
Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Ser Tyr Tyr Leu Phe Lys Thr Leu	
195 200 205	
ata aat gtt tcc att gtt gcc aca agc att gcg ata atc agt ctg tac	672
Ile Asn Val Ser Ile Val Ala Thr Ser Ile Ala Ile Ile Ser Leu Tyr	
210 215 220	

aag tct tac cgg gcg gtt ctg tta tca gcc agt ttg atg ggc ttg ttt Lys Ser Tyr Arg Ala Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe 225 230 235 240	720
att caa cag tgc gga tgg ttg tct cac gat ttt cta cac cat cag gta Ile Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe Leu His His Gln Val 245 250 255	768
ttt gag aca cgc tgg ctc aat gac gtt gtt ggc tat gtg gtc ggc aac Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Asp Val Val Gly Tyr Val Val Gly Asn 260 265 270	816
gtt gtt ctg gga ttc agt gtc tcg tgg tgg aag acc aag cac aac ctg Val Val Leu Gly Phe Ser Val Ser Trp Trp Lys Thr Lys His Asn Leu 275 280 285	864
cat cat gct gct ccg aat gaa tgc gac caa aag tac aca ccg att gat His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Lys Tyr Thr Pro Ile Asp 290 295 300	912
gag gat att gat act ctc ccc atc att gct tgg agt aaa gat ctc ttg Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Asp Leu Leu 305 310 315 320	960
gcc act gtt gag agc aag acc atg ttg cga gtt ctt cag tac cag cac Ala Thr Val Glu Ser Lys Thr Met Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His 325 330 335	1008
cta ttc ttt ttg gtt ctt ttg acg ttt gcc cgg gcg agt tgg cta ttt Leu Phe Phe Leu Val Leu Leu Thr Phe Ala Arg Ala Ser Trp Leu Phe 340 345 350	1056
tgg agc gcg gcc ttc act ctc agg ccc gag ttg acc ctt ggc gag aag Trp Ser Ala Ala Phe Thr Leu Arg Pro Glu Leu Thr Leu Gly Glu Lys 355 360 365	1104
ctt ttg gag agg gga acg atg gct ttg cac tac att tgg ttt aat agt Leu Leu Glu Arg Gly Thr Met Ala Leu His Tyr Ile Trp Phe Asn Ser 370 375 380	1152
gtt gcg ttt tat ctg ctc ccc gga tgg aaa cca gtt gta tgg atg gtg Val Ala Phe Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Val Val Trp Met Val 385 390 395 400	1200
gtc agc gag ctc atg tct ggt ttc ctg ctg gga tac gta ttt gta ctc Val Ser Glu Leu Met Ser Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Phe Val Leu 405 410 415	1248
agt cac aat gga atg gag gtg tac aat acg tca aag gac ttc gtg aat Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Thr Ser Lys Asp Phe Val Asn 420 425 430	1296
gcc cag att gca tcg act cgc gac atc aaa gca ggg gtg ttt aat gat Ala Gln Ile Ala Ser Thr Arg Asp Ile Lys Ala Gly Val Phe Asn Asp 435 440 445	1344
tgg ttc acc gga ggt ctc aac aga cag att gag cat cat cta ttt cca Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro 450 455 460	1392
acg atg ccc agg cac aac ctt aat aaa att tct cct cac gtg gag act Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ser Pro His Val Glu Thr 465 470 475 480	1440
ttg tgc aag aag cat gga ctg gtc tac gaa gac gtg agc atg gct tcg Leu Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Met Ala Ser 485 490 495	1488

ggc act tac cgg gtt ttg aaa aca ctt aag gac gtt gcc gat gct gct 1536  
 Gly Thr Tyr Arg Val Leu Lys Thr Leu Lys Asp Val Ala Asp Ala Ala  
                   500                  505                  510

tca cac cag cag ctt gct gcg agt tga 1563  
 Ser His Gln Gln Leu Ala Ala Ser  
                   515                  520

<210> 20

<211> 520

<212> PRT

<213> Ceratodon purpureus

<400> 20

Met Val Ser Gln Gly Gly Gly Leu Ser Gln Gly Ser Ile Glu Glu Asn  
 1                  5                  10                  15

Ile Asp Val Glu His Leu Ala Thr Met Pro Leu Val Ser Asp Phe Leu  
                   20                  25                  30

Asn Val Leu Gly Thr Thr Leu Gly Gln Trp Ser Leu Ser Thr Thr Phe  
                   35                  40                  45

Ala Phe Lys Arg Leu Thr Thr Lys Lys His Ser Ser Asp Ile Ser Val  
                   50                  55                  60

Glu Ala Gln Lys Glu Ser Val Ala Arg Gly Pro Val Glu Asn Ile Ser  
 65                  70                  75                  80

Gln Ser Val Ala Gln Pro Ile Arg Arg Arg Trp Val Gln Asp Lys Lys  
                   85                  90                  95

Pro Val Thr Tyr Ser Leu Lys Asp Val Ala Ser His Asp Met Pro Gln  
                   100                  105                  110

Asp Cys Trp Ile Ile Ile Lys Glu Lys Val Tyr Asp Val Ser Thr Phe  
                   115                  120                  125

Ala Glu Gln His Pro Gly Gly Thr Val Ile Asn Thr Tyr Phe Gly Arg  
                   130                  135                  140

Asp Ala Thr Asp Val Phe Ser Thr Phe His Ala Ser Thr Ser Trp Lys  
 145                  150                  155                  160

Ile Leu Gln Asn Phe Tyr Ile Gly Asn Leu Val Arg Glu Glu Pro Thr  
                   165                  170                  175

Leu Glu Leu Leu Lys Glu Tyr Arg Glu Leu Arg Ala Leu Phe Leu Arg  
                   180                  185                  190

Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Ser Tyr Tyr Leu Phe Lys Thr Leu  
 195 200 205

Ile Asn Val Ser Ile Val Ala Thr Ser Ile Ala Ile Ile Ser Leu Tyr  
 210 215 220

Lys Ser Tyr Arg Ala Val Leu Leu Ser Ala Ser Leu Met Gly Leu Phe  
 225 230 235 240

Ile Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe Leu His His Gln Val  
 245 250 255

Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Asp Val Val Gly Tyr Val Val Gly Asn  
 260 265 270

Val Val Leu Gly Phe Ser Val Ser Trp Trp Lys Thr Lys His Asn Leu  
 275 280 285

His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Lys Tyr Thr Pro Ile Asp  
 290 295 300

Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Ile Ile Ala Trp Ser Lys Asp Leu Leu  
 305 310 315 320

Ala Thr Val Glu Ser Lys Thr Met Leu Arg Val Leu Gln Tyr Gln His  
 325 330 335

Leu Phe Phe Leu Val Leu Leu Thr Phe Ala Arg Ala Ser Trp Leu Phe  
 340 345 350

Trp Ser Ala Ala Phe Thr Leu Arg Pro Glu Leu Thr Leu Gly Glu Lys  
 355 360 365

Leu Leu Glu Arg Gly Thr Met Ala Leu His Tyr Ile Trp Phe Asn Ser  
 370 375 380

Val Ala Phe Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro Val Val Trp Met Val  
 385 390 395 400

Val Ser Glu Leu Met Ser Gly Phe Leu Leu Gly Tyr Val Phe Val Leu  
 405 410 415

Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Thr Ser Lys Asp Phe Val Asn  
 420 425 430

Ala Gln Ile Ala Ser Thr Arg Asp Ile Lys Ala Gly Val Phe Asn Asp  
 435 440 445

Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu His His Leu Phe Pro  
 450 455 460

Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ser Pro His Val Glu Thr  
465 470 475 480

Leu Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp Val Ser Met Ala Ser  
485 490 495

Gly Thr Tyr Arg Val Leu Lys Thr Leu Lys Asp Val Ala Asp Ala Ala  
500 505 510

Ser His Gln Gln Leu Ala Ala Ser  
515 520

<210> 21

<211> 1434

<212> DNA

<213> *Phaeodactylum tricornutum*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1434)

<223> Delta-6-Desaturase

<400> 21  
atg ggc aaa gga ggg gac gct cgg gcc tcg aag ggc tca acg gcg gct 48  
Met Gly Lys Gly Gly Asp Ala Arg Ala Ser Lys Gly Ser Thr Ala Ala  
1 5 10 15  
cgc aag atc agt tgg cag gaa gtc aag acc cac gcg tct ccg gag gac 96  
Arg Lys Ile Ser Trp Gln Glu Val Lys Thr His Ala Ser Pro Glu Asp  
20 25 30  
gcc tgg atc att cac tcc aat aag gtc tac gac gtg tcc aac tgg cac 144  
Ala Trp Ile Ile His Ser Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Trp His  
35 40 45  
gaa cat ccc gga ggc gcc gtc att ttc acg cac gcc ggt gac gac atg 192  
Glu His Pro Gly Gly Ala Val Ile Phe Thr His Ala Gly Asp Asp Met  
50 55 60  
acg gac att ttc gct gcc ttt cac gca ccc gga tcg cag tcg ctc atg 240  
Thr Asp Ile Phe Ala Ala Phe His Ala Pro Gly Ser Gln Ser Leu Met  
65 70 75 80  
aag aag ttc tac att ggc gaa ttg ctc ccg gaa acc acc ggc aag gag 288  
Lys Lys Phe Tyr Ile Gly Glu Leu Leu Pro Glu Thr Thr Gly Lys Glu  
85 90 95  
ccg cag caa atc gcc ttt gaa aag ggc tac cgc gat ctg cgc tcc aaa 336  
Pro Gln Gln Ile Ala Phe Glu Lys Gly Tyr Arg Asp Leu Arg Ser Lys  
100 105 110  
ctc atc atg atg ggc atg ttc aag tcc aac aag tgg ttc tac gtc tac 384

## 40

Leu Ile Met Met, Gly Met Phe Lys Ser Asn Lys Trp Phe Tyr Val Tyr	
115 120 125	
aag tgc ctc agc aac atg gcc att tgg gcc gcc gcc tgt gct ctc gtc	432
Lys Cys Leu Ser Asn Met Ala Ile Trp Ala Ala Ala Cys Ala Leu Val	
130 135 140	
ttt tac tcg gac cgc ttc tgg gta cac ctg gcc agc gcc gtc atg ctg	480
Phe Tyr Ser Asp Arg Phe Trp Val His Leu Ala Ser Ala Val Met Leu	
145 150 155 160	
gga aca ttc ttt cag cag tcg gga tgg ttg gca cac gac ttt ctg cac	528
Gly Thr Phe Phe Gln Ser Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His	
165 170 175	
cac cag gtc ttc acc aag cgc aag cac ggg gat ctc gga gga ctc ttt	576
His Gln Val Phe Thr Lys Arg Lys His Gly Asp Leu Gly Leu Phe	
180 185 190	
tgg ggg aac ctc atg cag ggt tac tcc gta cag tgg tgg aaa aac aag	624
Trp Gly Asn Leu Met Gln Gly Tyr Ser Val Gln Trp Trp Lys Asn Lys	
195 200 205	
cac aac gga cac cac gcc gtc ccc aac ctc cac tgc tcc tcc gca gtc	672
His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His Cys Ser Ser Ala Val	
210 215 220	
gcg caa gat ggg gac ccg gac atc gat acc atg ccc ctt ctc gcc tgg	720
Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met Pro Leu Leu Ala Trp	
225 230 235 240	
tcc gtc cag caa gcc cag tct tac cgg gaa ctc caa gcc gac gga aag	768
Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu Gln Ala Asp Gly Lys	
245 250 255	
gat tcg ggt ttg gtc aag ttc atg atc cgt aac caa tcc tac ttt tac	816
Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn Gln Ser Tyr Phe Tyr	
260 265 270	
ttt ccc atc ttg ttg ctc gcc cgc ctg tcg tgg ttg aac gag tcc ttc	864
Phe Pro Ile Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Asn Glu Ser Phe	
275 280 285	
aag tgc gcc ttt ggg ctt gga gct gcg tcg gag aac gct gct ctc gaa	912
Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu Asn Ala Ala Leu Glu	
290 295 300	
ctc aag gcc aag ggt ctt cag tac ccc ctt ttg gaa aag gct ggc atc	960
Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu Glu Lys Ala Gly Ile	
305 310 315 320	
ctg ctg cac tac gct tgg atg ctt aca gtt tcg tcc ggc ttt gga cgc	1008
Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser Ser Gly Phe Gly Arg	
325 330 335	
ttc tcg ttc gcg tac acc gca ttt tac ttt cta acc gcg acc gcg tcc	1056
Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu Thr Ala Thr Ala Ser	
340 345 350	
tgt gga ttc ttg ctc gcc att gtc ttt ggc ctc ggc cac aac ggc atg	1104
Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu Gly His Asn Gly Met	
355 360 365	
gcc acc tac aat gcc gac gcc cgt ccg gac ttc tgg aag ctc caa gtc	1152
Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe Trp Lys Leu Gln Val	
370 375 380	
acc acg act cgc aac gtc acg ggc gga cac ggt ttc ccc caa gcc ttt	1200

## 41

Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly Phe Pro Gln Ala Phe  
 385 390 395 400

gtc gac tgg ttc tgt ggt ggc ctc cag tac caa gtc gac cac cac tta 1248  
 Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln Val Asp His His Leu  
 405 410 415

ttc ccc agc ctg ccc cga cac aat ctg gcc aag aca cac gca ctg gtc 1296  
 Phe Pro Ser Leu Pro Arg His Asn Leu Ala Lys Thr His Ala Leu Val  
 420 425 430

gaa tcg ttc tgc aag gag tgg ggt gtc cag tac cac gaa gcc gac ctt 1344  
 Glu Ser Phe Cys Lys Glu Trp Gly Val Gln Tyr His Glu Ala Asp Leu  
 435 440 445

gtg gac ggg acc atg gaa gtc ttg cac cat ttg ggc agc gtg gcc ggc 1392  
 Val Asp Gly Thr Met Glu Val Leu His His Leu Gly Ser Val Ala Gly  
 450 455 460

gaa ttc gtc gtg gat ttt gta cgc gat gga ccc gcc atg taa 1434  
 Glu Phe Val Val Asp Phe Val Arg Asp Gly Pro Ala Met  
 465 470 475

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 477

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phaeodactylum tricornutum

&lt;400&gt; 22

Met Gly Lys Gly Gly Asp Ala Arg Ala Ser Lys Gly Ser Thr Ala Ala  
 1 5 10 15

Arg Lys Ile Ser Trp Gln Glu Val Lys Thr His Ala Ser Pro Glu Asp  
 20 25 30

Ala Trp Ile Ile His Ser Asn Lys Val Tyr Asp Val Ser Asn Trp His  
 35 40 45

Glu His Pro Gly Gly Ala Val Ile Phe Thr His Ala Gly Asp Asp Met  
 50 55 60

Thr Asp Ile Phe Ala Ala Phe His Ala Pro Gly Ser Gln Ser Leu Met  
 65 70 75 80

Lys Lys Phe Tyr Ile Gly Glu Leu Leu Pro Glu Thr Thr Gly Lys Glu  
 85 90 95

Pro Gln Gln Ile Ala Phe Glu Lys Gly Tyr Arg Asp Leu Arg Ser Lys  
 100 105 110

Leu Ile Met Met Gly Met Phe Lys Ser Asn Lys Trp Phe Tyr Val Tyr  
 115 120 125



## 42

Lys Cys Leu Ser Asn Met Ala Ile Trp Ala Ala Ala Cys Ala Leu Val  
 130 135 140

Phe Tyr Ser Asp Arg Phe Trp Val His Leu Ala Ser Ala Val Met Leu  
 145 150 155 160

Gly Thr Phe Phe Gln Gln Ser Gly Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His  
 165 170 175

His Gln Val Phe Thr Lys Arg Lys His Gly Asp Leu Gly Gly Leu Phe  
 180 185 190

Trp Gly Asn Leu Met Gln Gly Tyr Ser Val Gln Trp Trp Lys Asn Lys  
 195 200 205

His Asn Gly His His Ala Val Pro Asn Leu His Cys Ser Ser Ala Val  
 210 215 220

Ala Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr Met Pro Leu Leu Ala Trp  
 225 230 235 240

Ser Val Gln Gln Ala Gln Ser Tyr Arg Glu Leu Gln Ala Asp Gly Lys  
 245 250 255

Asp Ser Gly Leu Val Lys Phe Met Ile Arg Asn Gln Ser Tyr Phe Tyr  
 260 265 270

Phe Pro Ile Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Asn Glu Ser Phe  
 275 280 285

Lys Cys Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala Ser Glu Asn Ala Ala Leu Glu  
 290 295 300

Leu Lys Ala Lys Gly Leu Gln Tyr Pro Leu Leu Glu Lys Ala Gly Ile  
 305 310 315 320

Leu Leu His Tyr Ala Trp Met Leu Thr Val Ser Ser Gly Phe Gly Arg  
 325 330 335

Phe Ser Phe Ala Tyr Thr Ala Phe Tyr Phe Leu Thr Ala Thr Ala Ser  
 340 345 350

Cys Gly Phe Leu Leu Ala Ile Val Phe Gly Leu Gly His Asn Gly Met  
 355 360 365

Ala Thr Tyr Asn Ala Asp Ala Arg Pro Asp Phe Trp Lys Leu Gln Val  
 370 375 380

Thr Thr Thr Arg Asn Val Thr Gly Gly His Gly Phe Pro Gln Ala Phe  
 385 390 395 400

## 43

Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln Tyr Gln Val Asp His His Leu  
 405 410 415

Phe Pro Ser Leu Pro Arg His Asn Leu Ala Lys Thr His Ala Leu Val  
 420 425 430

Glu Ser Phe Cys Lys Glu Trp Gly Val Gln Tyr His Glu Ala Asp Leu  
 435 440 445

Val Asp Gly Thr Met Glu Val Leu His His Leu Gly Ser Val Ala Gly  
 450 455 460

Glu Phe Val Val Asp Phe Val Arg Asp Gly Pro Ala Met  
 465 470 475

<210> 23

<211> 1578

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1578)

<223> Delta-6-Desaturase

<400> 23

atg gta ttc gcg ggc ggt gga ctt cag cag ggc tct ctc gaa gaa aac	48
Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn	
1 5 10 15	
atc gac gtc gag cac att gcc agt atg tct ctc ttc agc gac ttc ttc	96
Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe	
20 25 30	
agt tat gtg tct tca act gtt ggt tcg tgg agc gta cac agt ata caa	144
Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln	
35 40 45	
cct ttg aag cgc ctg acg agt aag aag cgt gtt tcg gaa agc gct gcc	192
Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala	
50 55 60	
gtg caa tgt ata tca gct gaa gtt cag aga aat tcg agt acc cag gga	240
Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly	
65 70 75 80	
act gcg gag gca ctc gca gaa tca gtc gtg aag ccc acg aga cga agg	288
Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg	
85 90 95	
tca tct cag tgg aag aag tcg aca cac ccc cta tca gaa gta gca gta	336
Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val	
100 105 110	

cac aac aag cca agc gat tgc tgg att gtt gta aaa aac aag gtg tat His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr 115 120 125	384
gat gtt tcc aat ttt gcg gac gag cat ccc gga gga tca gtt att agt Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser 130 135 140	432
act tat ttt gga cga gac ggc aca gat gtt ttc tct agt ttt cat gca Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala 145 150 155 160	480
gct tct aca tgg aaa att ctt caa gac ttt tac att ggt gac gtg gag Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu 165 170 175	528
agg gtg gag ccg act cca gag ctg ctg aaa gat ttc cga gaa atg aga Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg 180 185 190	576
gct ctt ttc ctg agg gag caa ctt ttc aaa agt tct aaa ttg tac tat Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr 195 200 205	624
gtt atg aag ctg ctc acg aat gtt gct att ttt gct gcg agc att gca Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala 210 215 220	672
ata ata tgt tgg agc aag act att tca gcg gtt ttg gct tca gct tgt Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys 225 230 235 240	720
atg atg gct ctg tgt ttc caa cag tgc gga tgg cta tcc cat gat ttt Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe 245 250 255	768
ctc cac aat cag gtg ttt gag aca cgc tgg ctt aat gaa gtt gtc ggg Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly 260 265 270	816
tat gtg atc ggc aac gcc gtt ctg ggg ttt agt aca ggg tgg tgg aag Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys 275 280 285	864
gag aag cat aac ctt cat cat gct gct cca aat gaa tgc gat cag act Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr 290 295 300	912
tac caa cca att gat gaa gat att gat act ctc ccc ctc att gcc tgg Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp 305 310 315 320	960
agc aag gac ata ctg gcc aca gtt gag aat aag aca ttc ttg cga atc Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile 325 330 335	1008
ctc caa tac cag cat ctg ttc ttc atg ggt ctg tta ttt ttc gcc cgt Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg 340 345 350	1056
ggg agt tgg ctc ttt tgg agc tgg aga tat acc tct aca gca gtg ctc Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu 355 360 365	1104
tca cct gtc gac agg ttg ttg gag aag gga act gtt ctg ttt cac tac Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr 370 375 380	1152

## 45

ttt tgg ttc gtc ggg aca gcg tgc tat ctt ctc cct ggt tgg aag cca 1200  
 Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro  
 385 390 395 400  
 tta gta tgg atg gcg gtg act gag ctc atg tcc ggc atg ctg ctg ggc 1248  
 Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly  
 405 410 415  
 ttt gta ttt gta ctt agc cac aat ggg atg gag gtt tat aat tcg tct 1296  
 Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser  
 420 425 430  
 aaa gaa ttc gtg agt gca cag atc gta tcc aca cgg gat atc aaa gga 1344  
 Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly  
 435 440 445  
 aac ata ttc aac gac tgg ttc act ggt ggc ctt aac agg caa ata gag 1392  
 Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu  
 450 455 460  
 cat cat ctt ttc cca aca atg ccc agg cat aat tta aac aaa ata gca 1440  
 His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala  
 465 470 475 480  
 cct aga gtg gag gtg ttc tgt aag aaa cac ggt ctg gtg tac gaa gac 1488  
 Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp  
 485 490 495  
 gta tct att gct acc ggc act tgc aag gtt ttg aaa gca ttg aag gaa 1536  
 Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu  
 500 505 510  
 gtc gcg gag gct gcg gca gag cag cat gct acc acc agt taa 1578  
 Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu His Ala Thr Thr Ser  
 515 520 525

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 525

&lt;212&gt; PRT

<213> *Physcomitrella patens*

&lt;400&gt; 24

Met Val Phe Ala Gly Gly Gly Leu Gln Gln Gly Ser Leu Glu Glu Asn  
 1 5 10 15

Ile Asp Val Glu His Ile Ala Ser Met Ser Leu Phe Ser Asp Phe Phe  
 20 25 30

Ser Tyr Val Ser Ser Thr Val Gly Ser Trp Ser Val His Ser Ile Gln  
 35 40 45

Pro Leu Lys Arg Leu Thr Ser Lys Lys Arg Val Ser Glu Ser Ala Ala  
 50 55 60

Val Gln Cys Ile Ser Ala Glu Val Gln Arg Asn Ser Ser Thr Gln Gly  
 65 70 75 80

Thr Ala Glu Ala Leu Ala Glu Ser Val Val Lys Pro Thr Arg Arg Arg  
 85 90 95

Ser Ser Gln Trp Lys Lys Ser Thr His Pro Leu Ser Glu Val Ala Val  
 100 105 110

His Asn Lys Pro Ser Asp Cys Trp Ile Val Val Lys Asn Lys Val Tyr  
 115 120 125

Asp Val Ser Asn Phe Ala Asp Glu His Pro Gly Gly Ser Val Ile Ser  
 130 135 140

Thr Tyr Phe Gly Arg Asp Gly Thr Asp Val Phe Ser Ser Phe His Ala  
 145 150 155 160

Ala Ser Thr Trp Lys Ile Leu Gln Asp Phe Tyr Ile Gly Asp Val Glu  
 165 170 175

Arg Val Glu Pro Thr Pro Glu Leu Leu Lys Asp Phe Arg Glu Met Arg  
 180 185 190

Ala Leu Phe Leu Arg Glu Gln Leu Phe Lys Ser Ser Lys Leu Tyr Tyr  
 195 200 205

Val Met Lys Leu Leu Thr Asn Val Ala Ile Phe Ala Ala Ser Ile Ala  
 210 215 220

Ile Ile Cys Trp Ser Lys Thr Ile Ser Ala Val Leu Ala Ser Ala Cys  
 225 230 235 240

Met Met Ala Leu Cys Phe Gln Gln Cys Gly Trp Leu Ser His Asp Phe  
 245 250 255

Leu His Asn Gln Val Phe Glu Thr Arg Trp Leu Asn Glu Val Val Gly  
 260 265 270

Tyr Val Ile Gly Asn Ala Val Leu Gly Phe Ser Thr Gly Trp Trp Lys  
 275 280 285

Glu Lys His Asn Leu His His Ala Ala Pro Asn Glu Cys Asp Gln Thr  
 290 295 300

Tyr Gln Pro Ile Asp Glu Asp Ile Asp Thr Leu Pro Leu Ile Ala Trp  
 305 310 315 320

Ser Lys Asp Ile Leu Ala Thr Val Glu Asn Lys Thr Phe Leu Arg Ile  
 325 330 335

Leu Gln Tyr Gln His Leu Phe Phe Met Gly Leu Leu Phe Phe Ala Arg  
 340 345 350

Gly Ser Trp Leu Phe Trp Ser Trp Arg Tyr Thr Ser Thr Ala Val Leu  
                   355                                  360                                  365

Ser Pro Val Asp Arg Leu Leu Glu Lys Gly Thr Val Leu Phe His Tyr  
           370                                  375                                  380

Phe Trp Phe Val Gly Thr Ala Cys Tyr Leu Leu Pro Gly Trp Lys Pro  
   385                                  390                                  395                                  400

Leu Val Trp Met Ala Val Thr Glu Leu Met Ser Gly Met Leu Leu Gly  
                                   405                                  410                                  415

Phe Val Phe Val Leu Ser His Asn Gly Met Glu Val Tyr Asn Ser Ser  
                                   420                                  425                                  430

Lys Glu Phe Val Ser Ala Gln Ile Val Ser Thr Arg Asp Ile Lys Gly  
                                   435                                  440                                  445

Asn Ile Phe Asn Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Arg Gln Ile Glu  
           450                                  455                                  460

His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg His Asn Leu Asn Lys Ile Ala  
   465                                  470                                  475                                  480

Pro Arg Val Glu Val Phe Cys Lys Lys His Gly Leu Val Tyr Glu Asp  
                                   485                                  490                                  495

Val Ser Ile Ala Thr Gly Thr Cys Lys Val Leu Lys Ala Leu Lys Glu  
                                   500                                  505                                  510

Val Ala Glu Ala Ala Ala Glu Gln His Ala Thr Thr Ser  
           515                                  520                                  525

<210> 25

<211> 1332

<212> DNA

<213> Caenorhabditis elegans

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1332)

<223> Delta-6-Desaturase

<400> 25

atg gtc gtc gac aag aat gcc tcc ggg ctt cga atg aag gtc gat ggc

48

Met Val Val Asp Lys Asn Ala Ser Gly Leu Arg Met Lys Val Asp Gly	
1 5 10 15	
aaa tgg ctc tac ctt agc gag gaa ttg gtg aag aaa cat cca gga gga	96
Lys Trp Leu Tyr Leu Ser Glu Glu Leu Val Lys Lys His Pro Gly Gly	
20 25 30	
gct gtt att gaa caa tat aga aat tgc gat gct act cat att ttc cac	144
Ala Val Ile Glu Gln Tyr Arg Asn Ser Asp Ala Thr His Ile Phe His	
35 40 45	
gct ttc cac gaa gga tct tct cag gct tat aag caa ctt gac ctt ctg	192
Ala Phe His Glu Gly Ser Ser Gln Ala Tyr Lys Gln Leu Asp Leu Leu	
50 55 60	
aaa aag cac gga gag cac gat gaa ttc ctt gag aaa caa ttg gaa aag	240
Lys Lys His Gly Glu His Asp Glu Phe Leu Glu Lys Gln Leu Glu Lys	
65 70 75 80	
aga ctt gac aaa gtt gat atc aat gta tca gca tat gat gtc agt gtt	288
Arg Leu Asp Lys Val Asp Ile Asn Val Ser Ala Tyr Asp Val Ser Val	
85 90 95	
gca caa gaa aag aaa atg gtt gaa tca ttc gaa aaa cta cga cag aag	336
Ala Gln Glu Lys Lys Met Val Glu Ser Phe Glu Lys Leu Arg Gln Lys	
100 105 110	
ctt cat gat gat gga tta atg aaa gca aat gaa aca tat ttc ctg ttt	384
Leu His Asp Asp Gly Leu Met Lys Ala Asn Glu Thr Tyr Phe Leu Phe	
115 120 125	
aaa gcg att tca aca ctt tca att atg gca ttt gca ttt tat ctt cag	432
Lys Ala Ile Ser Thr Leu Ser Ile Met Ala Phe Ala Phe Tyr Leu Gln	
130 135 140	
tat ctt gga tgg tat att act tct gca tgt tta tta gca ctt gca tgg	480
Tyr Leu Gly Trp Tyr Ile Thr Ser Ala Cys Leu Leu Ala Leu Ala Trp	
145 150 155 160	
caa caa ttc gga tgg tta aca cat gag ttc tgc cat caa cag cca aca	528
Gln Gln Phe Gly Trp Leu Thr His Glu Phe Cys His Gln Gln Pro Thr	
165 170 175	
aag aac aga cct ttg aat gat act att tct ttg ttc ttt ggt aat ttc	576
Lys Asn Arg Pro Leu Asn Asp Thr Ile Ser Leu Phe Phe Gly Asn Phe	
180 185 190	
tta caa gga ttt tca aga gat tgg tgg aag gac aag cat aac act cat	624
Leu Gln Gly Phe Ser Arg Asp Trp Trp Lys Asp Lys His Asn Thr His	
195 200 205	
cac gct gcc aca aat gta att gat cat gac ggt gat atc gac ttg gca	672
His Ala Ala Thr Asn Val Ile Asp His Asp Gly Asp Ile Asp Leu Ala	
210 215 220	
cca ctt ttc gca ttt att cca gga gat ttg tgc aag tat aag gcc agc	720
Pro Leu Phe Ala Phe Ile Pro Gly Asp Leu Cys Lys Tyr Lys Ala Ser	
225 230 235 240	
ttt gaa aaa gca att ctc aag att gta cca tat caa cat ctc tat ttc	768
Phe Glu Lys Ala Ile Leu Lys Ile Val Pro Tyr Gln His Leu Tyr Phe	
245 250 255	
acc gca atg ctt cca atg ctc cgt ttc tca tgg act ggt cag tca gtt	816
Thr Ala Met Leu Pro Met Leu Arg Phe Ser Trp Thr Gly Gln Ser Val	
260 265 270	
caa tgg gta ttc aaa gag aat caa atg gag tac aag gtc tat caa aga	864

## 49

Gln Trp Val Phe Lys Glu Asn Gln Met Glu Tyr Lys Val Tyr Gln Arg  
 275 280 285

aat gca ttc tgg gag caa gca aca att gtt gga cat tgg gct tgg gta 912  
 Asn Ala Phe Trp Glu Gln Ala Thr Ile Val Gly His Trp Ala Trp Val  
 290 295 300

ttc tat caa ttg ttc tta tta cca aca tgg cca ctt cgg gtt gct tat 960  
 Phe Tyr Gln Leu Phe Leu Pro Thr Trp Pro Leu Arg Val Ala Tyr  
 305 310 315 320

ttc att att tca caa atg gga gga ggc ctt ttg att gct cac gta gtc 1008  
 Phe Ile Ile Ser Gln Met Gly Gly Leu Ile Ala His Val Val  
 325 330 335

act ttc aac cat aac tct gtt gat aag tat cca gcc aat tct cga att 1056  
 Thr Phe Asn His Asn Ser Val Asp Lys Tyr Pro Ala Asn Ser Arg Ile  
 340 345 350

tta aac aac ttc gcc gct ctt caa att ttg acc aca cgc aac atg act 1104  
 Leu Asn Asn Phe Ala Ala Leu Gln Ile Leu Thr Thr Arg Asn Met Thr  
 355 360 365

cca tct cca ttc att gat tgg ctt tgg ggt gga ctc aat tat cag atc 1152  
 Pro Ser Pro Phe Ile Asp Trp Leu Trp Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile  
 370 375 380

gag cac cac ttg ttc cca aca atg cca cgt tgc aat ctg aat gct tgc 1200  
 Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg Cys Asn Leu Asn Ala Cys  
 385 390 395 400

gtg aaa tat gtg aaa gaa tgg tgc aaa gag aat aat ctt cct tac ctc 1248  
 Val Lys Tyr Val Lys Glu Trp Cys Lys Glu Asn Asn Leu Pro Tyr Leu  
 405 410 415

gtc gat gac tac ttt gac gga tat gca atg aat ttg caa caa ttg aaa 1296  
 Val Asp Asp Tyr Phe Asp Gly Tyr Ala Met Asn Leu Gln Gln Leu Lys  
 420 425 430

aat atg gct gag cac att caa gct aaa gct gcc taa 1332  
 Asn Met Ala Glu His Ile Gln Ala Lys Ala Ala  
 435 440

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 443

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Caenorhabditis elegans

&lt;400&gt; 26

Met Val Val Asp Lys Asn Ala Ser Gly Leu Arg Met Lys Val Asp Gly  
 1 5 10 15

Lys Trp Leu Tyr Leu Ser Glu Glu Leu Val Lys Lys His Pro Gly Gly  
 20 25 30

Ala Val Ile Glu Gln Tyr Arg Asn Ser Asp Ala Thr His Ile Phe His  
 35 40 45



## 50

Ala Phe His Glu Gly Ser Ser Gln Ala Tyr Lys Gln Leu Asp Leu Leu  
 50 55 60

Lys Lys His Gly Glu His Asp Glu Phe Leu Glu Lys Gln Leu Glu Lys  
 65 70 75 80

Arg Leu Asp Lys Val Asp Ile Asn Val Ser Ala Tyr Asp Val Ser Val  
 85 90 95

Ala Gln Glu Lys Lys Met Val Glu Ser Phe Glu Lys Leu Arg Gln Lys  
 100 105 110

Leu His Asp Asp Gly Leu Met Lys Ala Asn Glu Thr Tyr Phe Leu Phe  
 115 120 125

Lys Ala Ile Ser Thr Leu Ser Ile Met Ala Phe Ala Phe Tyr Leu Gln  
 130 135 140

Tyr Leu Gly Trp Tyr Ile Thr Ser Ala Cys Leu Leu Ala Leu Ala Trp  
 145 150 155 160

Gln Gln Phe Gly Trp Leu Thr His Glu Phe Cys His Gln Gln Pro Thr  
 165 170 175

Lys Asn Arg Pro Leu Asn Asp Thr Ile Ser Leu Phe Phe Gly Asn Phe  
 180 185 190

Leu Gln Gly Phe Ser Arg Asp Trp Trp Lys Asp Lys His Asn Thr His  
 195 200 205

His Ala Ala Thr Asn Val Ile Asp His Asp Gly Asp Ile Asp Leu Ala  
 210 215 220

Pro Leu Phe Ala Phe Ile Pro Gly Asp Leu Cys Lys Tyr Lys Ala Ser  
 225 230 235 240

Phe Glu Lys Ala Ile Leu Lys Ile Val Pro Tyr Gln His Leu Tyr Phe  
 245 250 255

Thr Ala Met Leu Pro Met Leu Arg Phe Ser Trp Thr Gly Gln Ser Val  
 260 265 270

Gln Trp Val Phe Lys Glu Asn Gln Met Glu Tyr Lys Val Tyr Gln Arg  
 275 280 285

Asn Ala Phe Trp Glu Gln Ala Thr Ile Val Gly His Trp Ala Trp Val  
 290 295 300

Phe Tyr Gln Leu Phe Leu Leu Pro Thr Trp Pro Leu Arg Val Ala Tyr  
 305 310 315 320

## 51

Phe Ile Ile Ser Gln Met Gly Gly Gly Leu Leu Ile Ala His Val Val  
325 330 335

Thr Phe Asn His Asn Ser Val Asp Lys Tyr Pro Ala Asn Ser Arg Ile  
340 345 350

Leu Asn Asn Phe Ala Ala Leu Gln Ile Leu Thr Thr Arg Asn Met Thr  
355 360 365

Pro Ser Pro Phe Ile Asp Trp Leu Trp Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile  
370 375 380

Glu His His Leu Phe Pro Thr Met Pro Arg Cys Asn Leu Asn Ala Cys  
385 390 395 400

Val Lys Tyr Val Lys Glu Trp Cys Lys Glu Asn Asn Leu Pro Tyr Leu  
405 410 415

Val Asp Asp Tyr Phe Asp Gly Tyr Ala Met Asn Leu Gln Gln Leu Lys  
420 425 430

Asn Met Ala Glu His Ile Gln Ala Lys Ala Ala  
435 440

<210> 27

<211> 873

<212> DNA

<213> *Physcomitrella patens*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(873)

<223> Delta-6-Elongase

<400> 27

atg gag gtc gtg gag aga ttc tac ggt gag ttg gat ggg aag gtc tcg 48  
Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser  
1 5 10 15

cag ggc gtg aat gca ttg ctg ggt agt ttt ggg gtg gag ttg acg gat 96  
Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp  
20 25 30

acg ccc act acc aaa ggc ttg ccc ctc gtt gac agt ccc aca ccc atc 144  
Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile  
35 40 45

gtc ctc ggt gtt tct gta tac ttg act att gtc att gga ggg ctt ttg 192  
Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu  
50 55 60

tgg ata aag gcc agg gat ctg aaa ccg cgc gcc tcg gag cca ttt ttg 240  
 Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu  
 65 70 75 80

ctc caa gct ttg gtg ctt gtg cac aac ctg ttc tgt ttt gcg ctc agt 288  
 Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser  
 85 90 95

ctg tat atg tgc gtg ggc atc gct tat cag gct att acc tgg cgg tac 336  
 Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr  
 100 105 110

tct ctc tgg ggc aat gca tac aat cct aaa cat aaa gag atg gcg att 384  
 Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile  
 115 120 125

ctg gta tac ttg ttc tac atg tct aag tac gtg gaa ttc atg gat acc 432  
 Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr  
 130 135 140

gtt atc atg ata ctg aag cgc agc acc agg caa ata agc ttc ctc cac 480  
 Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His  
 145 150 155 160

gtt tat cat cat tct tca att tcc ctc att tgg tgg gct att gct cat 528  
 Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His  
 165 170 175

cac gct cct ggc ggt gaa gca tat tgg tct gcg gct ctg aac tca gga 576  
 His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly  
 180 185 190

gtg cat gtt ctc atg tat gcg tat tac ttc ttg gct gcc tgc ctt cga 624  
 Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg  
 195 200 205

agt agc cca aag tta aaa aat aag tac ctt ttt tgg ggc agg tac ttg 672  
 Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu  
 210 215 220

aca caa ttc caa atg ttc cag ttt atg ctg aac tta gtg cag gct tac 720  
 Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr  
 225 230 235 240

tac gac atg aaa acg aat gcg cca tat cca caa tgg ctg atc aag att 768  
 Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile  
 245 250 255

ttg ttc tac tac atg atc tcg ttg ctg ttt ctt ttc ggc aat ttt tac 816  
 Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr  
 260 265 270

gta caa aaa tac atc aaa ccc tct gac gga aag caa aag gga gct aaa 864  
 Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys  
 275 280 285

act gag tga 873  
 Thr Glu  
 290

&lt;210&gt; .28

&lt;211&gt; 290

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Physcomitrella patens

&lt;400&gt; 28

Met Glu Val Val Glu Arg Phe Tyr Gly Glu Leu Asp Gly Lys Val Ser  
 1 5 10 15

Gln Gly Val Asn Ala Leu Leu Gly Ser Phe Gly Val Glu Leu Thr Asp  
 20 25 30

Thr Pro Thr Thr Lys Gly Leu Pro Leu Val Asp Ser Pro Thr Pro Ile  
 35 40 45

Val Leu Gly Val Ser Val Tyr Leu Thr Ile Val Ile Gly Gly Leu Leu  
 50 55 60

Trp Ile Lys Ala Arg Asp Leu Lys Pro Arg Ala Ser Glu Pro Phe Leu  
 65 70 75 80

Leu Gln Ala Leu Val Leu Val His Asn Leu Phe Cys Phe Ala Leu Ser  
 85 90 95

Leu Tyr Met Cys Val Gly Ile Ala Tyr Gln Ala Ile Thr Trp Arg Tyr  
 100 105 110

Ser Leu Trp Gly Asn Ala Tyr Asn Pro Lys His Lys Glu Met Ala Ile  
 115 120 125

Leu Val Tyr Leu Phe Tyr Met Ser Lys Tyr Val Glu Phe Met Asp Thr  
 130 135 140

Val Ile Met Ile Leu Lys Arg Ser Thr Arg Gln Ile Ser Phe Leu His  
 145 150 155 160

Val Tyr His His Ser Ser Ile Ser Leu Ile Trp Trp Ala Ile Ala His  
 165 170 175

His Ala Pro Gly Gly Glu Ala Tyr Trp Ser Ala Ala Leu Asn Ser Gly  
 180 185 190

Val His Val Leu Met Tyr Ala Tyr Tyr Phe Leu Ala Ala Cys Leu Arg  
 195 200 205

Ser Ser Pro Lys Leu Lys Asn Lys Tyr Leu Phe Trp Gly Arg Tyr Leu  
 210 215 220

Thr Gln Phe Gln Met Phe Gln Phe Met Leu Asn Leu Val Gln Ala Tyr  
 225 230 235 240

Tyr Asp Met Lys Thr Asn Ala Pro Tyr Pro Gln Trp Leu Ile Lys Ile  
 245 250 255

Leu Phe Tyr Tyr Met Ile Ser Leu Leu Phe Leu Phe Gly Asn Phe Tyr  
 260 265 270

Val Gln Lys Tyr Ile Lys Pro Ser Asp Gly Lys Gln Lys Gly Ala Lys  
 275 280 285

Thr Glu  
 290

<210> 29

<211> 1049

<212> DNA

<213> Thraustochytrium

<220>

<221> CDS

<222> (43)..(858)

<223> Delta-6-Elongase

<400> 29

gaattcggca cgagagcgcg cggagcggag acctcggccg cg atg atg gag ccg	54
Met Met Glu Pro	
1	
ctc gac agg tac agg gcg ctg gcg gag ctc gcc gcg agg tac gcc agc	102
Leu Asp Arg Tyr Arg Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala Arg Tyr Ala Ser	
5 10 15 20	
tgc gcg gcc ttc aag tgg caa gtc acg tac gac gcc aag gac agc ttc	150
Ser Ala Ala Phe Lys Trp Gln Val Thr Tyr Asp Ala Lys Asp Ser Phe	
25 30 35	
gtc ggg ccc ctg gga atc cgg gag ccg ctc ggg ctc ctg gtg ggc tcc	198
Val Gly Pro Leu Gly Ile Arg Glu Pro Leu Gly Leu Leu Val Gly Ser	
40 45 50	
gtg gtc ctc tac ctg agc ctg ctg gcc gtg gtc tac gcg ctg cgg aac	246
Val Val Leu Tyr Leu Ser Leu Leu Ala Val Val Tyr Ala Leu Arg Asn	
55 60 65	
tac ctt ggc ggc ctc atg gcg ctc cgc agc gtg cat aac ctc ggg ctc	294
Tyr Leu Gly Gly Leu Met Ala Leu Arg Ser Val His Asn Leu Gly Leu	
70 75 80	
tgc ctc ttc tgc ggc gcc gtg tgg atc tac acg agc tac ctc atg atc	342
Cys Leu Phe Ser Gly Ala Val Trp Ile Tyr Thr Ser Tyr Leu Met Ile	
85 90 95 100	
cag gat ggg cac ttt cgc agc ctc gag gcg gca acg tgc gag ccg ctc	390
Gln Asp Gly His Phe Arg Ser Leu Glu Ala Ala Thr Cys Glu Pro Leu	
105 110 115	
aag cat ccg cac ttc cag ctc atc agc ttg ctc ttt gcg ctg tcc aag	438

## 55

Lys His Pro His Phe Gln Leu Ile Ser Leu Leu Phe Ala Leu Ser Lys  
 120 125 130  
 atc tgg gag tgg ttc gac acg gtg ctc ctc atc gtc aag ggc aac aag 486  
 Ile Trp Glu Trp Phe Asp Thr Val Leu Leu Ile Val Lys Gly Asn Lys  
 135 140 145  
 ctc cgc ttc ctg cac gtc ttg cac cac gcc acg acc ttt tgg ctc tac 534  
 Leu Arg Phe Leu His Val Leu His His Ala Thr Thr Phe Trp Leu Tyr  
 150 155 160  
 gcc atc gac cac atc ttt ctc tgc tcc atc aag tac ggc gtc gcg gtc 582  
 Ala Ile Asp His Ile Phe Leu Ser Ser Ile Lys Tyr Gly Val Ala Val  
 165 170 175 180  
 aat gct ttc atc cac acc gtc atg tac gcg cac tac ttc cgc cca ttc 630  
 Asn Ala Phe Ile His Thr Val Met Tyr Ala His Tyr Phe Arg Pro Phe  
 185 190 195  
 ccg aag ggc ttg cgc ccg ctt att acg cag ttg cag atc gtc cag ttc 678  
 Pro Lys Gly Leu Arg Pro Leu Ile Thr Gln Leu Gln Ile Val Gln Phe  
 200 205 210  
 att ttc agc atc ggc atc cat acc gcc att tac tgg cac tac gac tgc 726  
 Ile Phe Ser Ile Gly Ile His Thr Ala Ile Tyr Trp His Tyr Asp Cys  
 215 220 225  
 gag ccg ctc gtg cat acc cac ttt tgg gaa tac gtc acg ccc tac ctt 774  
 Glu Pro Leu Val His Thr His Phe Trp Glu Tyr Val Thr Pro Tyr Leu  
 230 235 240  
 ttc gtc gtg ccc ttc ctc atc ctc ttt ttc aat ttt tac ctg cag cag 822  
 Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Leu Phe Phe Asn Phe Tyr Leu Gln Gln  
 245 250 255 260  
 tac gtc ctc gcg ccc gca aaa acc aag aag gca tag ccacgtaaca 868  
 Tyr Val Leu Ala Pro Ala Lys Thr Lys Lys Ala  
 265 270  
 gtagaccagc agcgccgagg acgcgtgccg cggtatcgcg aagcacgaaa taaagaagat 928  
 catttgattc aacgaggcta cttgcggcca cgagaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 988  
 aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1048  
 c 1049  
 <210> 30  
 <211> 271  
 <212> PRT  
 <213> Thraustochytrium  
 <400> 30  
 Met Met Glu Pro Leu Asp Arg Tyr Arg Ala Leu Ala Glu Leu Ala Ala  
 1 5 10 15  
 Arg Tyr Ala Ser Ser Ala Ala Phe Lys Trp Gln Val Thr Tyr Asp Ala  
 20 25 30

## 56

Lys Asp Ser Phe Val Gly Pro Leu Gly Ile Arg Glu Pro Leu Gly Leu  
 35 40 45

Leu Val Gly Ser Val Val Leu Tyr Leu Ser Leu Leu Ala Val Val Tyr  
 50 55 60

Ala Leu Arg Asn Tyr Leu Gly Gly Leu Met Ala Leu Arg Ser Val His  
 65 70 75 80

Asn Leu Gly Leu Cys Leu Phe Ser Gly Ala Val Trp Ile Tyr Thr Ser  
 85 90 95

Tyr Leu Met Ile Gln Asp Gly His Phe Arg Ser Leu Glu Ala Ala Thr  
 100 105 110

Cys Glu Pro Leu Lys His Pro His Phe Gln Leu Ile Ser Leu Leu Phe  
 115 120 125

Ala Leu Ser Lys Ile Trp Glu Trp Phe Asp Thr Val Leu Leu Ile Val  
 130 135 140

Lys Gly Asn Lys Leu Arg Phe Leu His Val Leu His His Ala Thr Thr  
 145 150 155 160

Phe Trp Leu Tyr Ala Ile Asp His Ile Phe Leu Ser Ser Ile Lys Tyr  
 165 170 175

Gly Val Ala Val Asn Ala Phe Ile His Thr Val Met Tyr Ala His Tyr  
 180 185 190

Phe Arg Pro Phe Pro Lys Gly Leu Arg Pro Leu Ile Thr Gln Leu Gln  
 195 200 205

Ile Val Gln Phe Ile Phe Ser Ile Gly Ile His Thr Ala Ile Tyr Trp  
 210 215 220

His Tyr Asp Cys Glu Pro Leu Val His Thr His Phe Trp Glu Tyr Val  
 225 230 235 240

Thr Pro Tyr Leu Phe Val Val Pro Phe Leu Ile Leu Phe Phe Asn Phe  
 245 250 255

Tyr Leu Gln Gln Tyr Val Leu Ala Pro Ala Lys Thr Lys Lys Ala  
 260 265 270

<210> 31

<211> 837

<212> DNA

<213> Phytophthora infestans

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(837)

&lt;223&gt; Delta-6-Elongase

&lt;400&gt; 31

```

atg tcg act gag cta ctg cag agc tac tac gcg tgg gcc aac gcc acg      48
Met Ser Thr Glu Leu Leu Gln Ser Tyr Tyr Ala Trp Ala Asn Ala Thr
1          5          10          15

gag gcc aag ctg ctg gac tgg gtc gac cct gag ggc ggc tgg aag gtg      96
Glu Ala Lys Leu Leu Asp Trp Val Asp Pro Glu Gly Gly Trp Lys Val
          20          25          30

cat cct atg gca gac tac ccc cta gcc aac ttc tcc agc gtc tac gcc      144
His Pro Met Ala Asp Tyr Pro Leu Ala Asn Phe Ser Ser Val Tyr Ala
          35          40          45

atc tgc gtc gga tac ttg ctc ttc gta atc ttc ggc acg gcc ctg atg      192
Ile Cys Val Gly Tyr Leu Leu Phe Val Ile Phe Gly Thr Ala Leu Met
          50          55          60

aaa atg gga gtc ccc gcc atc aag acc agt cca tta cag ttt gtg tac      240
Lys Met Gly Val Pro Ala Ile Lys Thr Ser Pro Leu Gln Phe Val Tyr
          65          70          75          80

aac ccc atc caa gtc att gcc tgc tct tat atg tgc gtg gag gcc gcc      288
Asn Pro Ile Gln Val Ile Ala Cys Ser Tyr Met Cys Val Glu Ala Ala
          85          90          95

atc cag gcc tac cgc aac ggc tac acc gcc gcc ccg tgc aac gcc ttt      336
Ile Gln Ala Tyr Arg Asn Gly Tyr Thr Ala Ala Pro Cys Asn Ala Phe
          100          105          110

aag tcc gac gac ccc gtc atg ggc aac gtt ctg tac ctc ttc tat ctc      384
Lys Ser Asp Asp Pro Val Met Gly Asn Val Leu Tyr Leu Phe Tyr Leu
          115          120          125

tcc aag atg ctc gac ctg tgc gac aca gtc ttc att atc cta gga aag      432
Ser Lys Met Leu Asp Leu Cys Asp Thr Val Phe Ile Ile Leu Gly Lys
          130          135          140

aag tgg aaa cag ctt tcc atc ttg cac gtg tac cac cac ctt acc gtg      480
Lys Trp Lys Gln Leu Ser Ile Leu His Val Tyr His His Leu Thr Val
          145          150          155          160

ctt ttc gtc tac tat gtg acg ttc cgc gcc gct cag gac ggg gac tca      528
Leu Phe Val Tyr Tyr Val Thr Phe Arg Ala Ala Gln Asp Gly Asp Ser
          165          170          175

tat gct acc atc gtg ctc aac ggc ttc gtg cac acc atc atg tac act      576
Tyr Ala Thr Ile Val Leu Asn Gly Phe Val His Thr Ile Met Tyr Thr
          180          185          190

tac tac ttc gtc agc gcc cac acg cgc aac att tgg tgg aag aag tac      624
Tyr Tyr Phe Val Ser Ala His Thr Arg Asn Ile Trp Trp Lys Lys Tyr
          195          200          205

ctc acg cgc att cag ctt atc cag ttc gtg acc atg aac gtg cag gcc      672
Leu Thr Arg Ile Gln Leu Ile Gln Phe Val Thr Met Asn Val Gln Gly
          210          215          220

```



58

tac ctg acc tac tct cga cag tgc cca ggc atg cct cct aag gtg ccg 720  
 Tyr Leu Thr Tyr Ser Arg Gln Cys Pro Gly Met Pro Pro Lys Val Pro  
 225 230 235 240

ctc atg tac ctt gtg tac gtg cag tca ctc ttc tgg ctc ttc atg aat 768  
 Leu Met Tyr Leu Val Tyr Val Gln Ser Leu Phe Trp Leu Phe Met Asn  
 245 250 255

ttc tac att cgc gcg tac gtg ttc ggc ccc aag aaa ccg gcc gtg gag 816  
 Phe Tyr Ile Arg Ala Tyr Val Phe Gly Pro Lys Lys Pro Ala Val Glu  
 260 265 270

gaa tcg aag aag aag ttg taa 837  
 Glu Ser Lys Lys Lys Leu  
 275

<210> 32

<211> 278

<212> PRT

<213> *Phytophthora infestans*

<400> 32

Met Ser Thr Glu Leu Leu Gln Ser Tyr Tyr Ala Trp Ala Asn Ala Thr  
 1 5 10 15

Glu Ala Lys Leu Leu Asp Trp Val Asp Pro Glu Gly Gly Trp Lys Val  
 20 25 30

His Pro Met Ala Asp Tyr Pro Leu Ala Asn Phe Ser Ser Val Tyr Ala  
 35 40 45

Ile Cys Val Gly Tyr Leu Leu Phe Val Ile Phe Gly Thr Ala Leu Met  
 50 55 60

Lys Met Gly Val Pro Ala Ile Lys Thr Ser Pro Leu Gln Phe Val Tyr  
 65 70 75 80

Asn Pro Ile Gln Val Ile Ala Cys Ser Tyr Met Cys Val Glu Ala Ala  
 85 90 95

Ile Gln Ala Tyr Arg Asn Gly Tyr Thr Ala Ala Pro Cys Asn Ala Phe  
 100 105 110

Lys Ser Asp Asp Pro Val Met Gly Asn Val Leu Tyr Leu Phe Tyr Leu  
 115 120 125

Ser Lys Met Leu Asp Leu Cys Asp Thr Val Phe Ile Ile Leu Gly Lys  
 130 135 140

Lys Trp Lys Gln Leu Ser Ile Leu His Val Tyr His His Leu Thr Val  
 145 150 155 160

Leu Phe Val Tyr Tyr Val Thr Phe Arg Ala Ala Gln Asp Gly Asp Ser  
 165 170 175

Tyr Ala Thr Ile Val Leu Asn Gly Phe Val His Thr Ile Met Tyr Thr  
 180 185 190

Tyr Tyr Phe Val Ser Ala His Thr Arg Asn Ile Trp Trp Lys Lys Tyr  
 195 200 205

Leu Thr Arg Ile Gln Leu Ile Gln Phe Val Thr Met Asn Val Gln Gly  
 210 215 220

Tyr Leu Thr Tyr Ser Arg Gln Cys Pro Gly Met Pro Pro Lys Val Pro  
 225 230 235 240

Leu Met Tyr Leu Val Tyr Val Gln Ser Leu Phe Trp Leu Phe Met Asn  
 245 250 255

Phe Tyr Ile Arg Ala Tyr Val Phe Gly Pro Lys Lys Pro Ala Val Glu  
 260 265 270

Glu Ser Lys Lys Lys Leu  
 275

<210> 33

<211> 954

<212> DNA

<213> Mortierella alpina

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(954)

<223> Delta-6-Elongase

<400> 33

atg gcc gcc gca atc ttg gac aag gtc aac ttc ggc att gat cag ccc 48  
 Met Ala Ala Ala Ile Leu Asp Lys Val Asn Phe Gly Ile Asp Gln Pro  
 1 5 10 15

ttc gga atc aag ctc gac acc tac ttt gct cag gcc tat gaa ctc gtc 96  
 Phe Gly Ile Lys Leu Asp Thr Tyr Phe Ala Gln Ala Tyr Glu Leu Val  
 20 25 30

acc gga aag tcc atc gac tcc ttc gtc ttc cag gag ggc gtc acg cct 144  
 Thr Gly Lys Ser Ile Asp Ser Phe Val Phe Gln Glu Gly Val Thr Pro  
 35 40 45

ctc tcg acc cag aga gag gtc gcc atg tgg act atc act tac ttc gtc 192

Leu Ser Thr Gln Arg Glu Val Ala Met Trp Thr Ile Thr Tyr Phe Val	
50 55 60	
gtc atc ttt ggt ggt cgc cag atc atg aag agc cag gac gcc ttc aag	240
Val Ile Phe Gly Gly Arg Gln Ile Met Lys Ser Gln Asp Ala Phe Lys	
65 70 75 80	
ctc aag ccc ctc ttc atc ctc cac aac ttc ctc ctg acg atc gcg tcc	288
Leu Lys Pro Leu Phe Ile Leu His Asn Phe Leu Leu Thr Ile Ala Ser	
85 90 95	
gga tgc ctg ttg ctc ctg ttc atc gag aac ctg gtc ccc atc ctc gcc	336
Gly Ser Leu Leu Leu Phe Ile Glu Asn Leu Val Pro Ile Leu Ala	
100 105 110	
aga aac gga ctt ttc tac gcc atc tgc gac gac ggt gcc tgg acc cag	384
Arg Asn Gly Leu Phe Tyr Ala Ile Cys Asp Asp Gly Ala Trp Thr Gln	
115 120 125	
cgc ctc gag ctc ctc tac tac ctc aac tac ctg gtc aag tac tgg gag	432
Arg Leu Glu Leu Leu Tyr Tyr Leu Asn Tyr Leu Val Lys Tyr Trp Glu	
130 135 140	
ttg gcc gac acc gtc ttt ttg gtc ctc aag aag aag cct ctt gag ttc	480
Leu Ala Asp Thr Val Phe Leu Val Leu Lys Lys Lys Pro Leu Glu Phe	
145 150 155 160	
ctg cac tac ttc cac cac tgc atg acc atg gtt ctc tgc ttt gtc cag	528
Leu His Tyr Phe His His Ser Met Thr Met Val Leu Cys Phe Val Gln	
165 170 175	
ctt gga gga tac act tca gtg tcc tgg gtc cct att acc ctc aac ttg	576
Leu Gly Gly Tyr Thr Ser Val Ser Trp Val Pro Ile Thr Leu Asn Leu	
180 185 190	
act gtc cac gtc ttc atg tac tac tac tac atg cgc tcc gct gcc ggt	624
Thr Val His Val Phe Met Tyr Tyr Tyr Tyr Met Arg Ser Ala Ala Gly	
195 200 205	
gtt cgc atc tgg tgg aag cag tac ttg acc act ctc cag atc gtc cag	672
Val Arg Ile Trp Trp Lys Gln Tyr Leu Thr Thr Leu Gln Ile Val Gln	
210 215 220	
ttc gtt ctt gac ctc gga ttc atc tac ttc tgc gcc tac acc tac ttc	720
Phe Val Leu Asp Leu Gly Phe Ile Tyr Phe Cys Ala Tyr Thr Tyr Phe	
225 230 235 240	
gcc ttc acc tac ttc ccc tgg gct ccc aac gtc ggc aag tgc gcc ggt	768
Ala Phe Thr Tyr Phe Pro Trp Ala Pro Asn Val Gly Lys Cys Ala Gly	
245 250 255	
acc gag ggt gct gct ctc ttt ggc tgc gga ctc ctc tcc agc tat ctc	816
Thr Glu Gly Ala Ala Leu Phe Gly Cys Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Leu	
260 265 270	
ttg ctc ttt atc aac ttc tac cgc att acc tac aat gcc aag gcc aag	864
Leu Leu Phe Ile Asn Phe Tyr Arg Ile Thr Tyr Asn Ala Lys Ala Lys	
275 280 285	
gca gcc aag gag cgt gga agc aac ttt acc ccc aag act gtc aag tcc	912
Ala Ala Lys Glu Arg Gly Ser Asn Phe Thr Pro Lys Thr Val Lys Ser	
290 295 300	
ggc gga tgc ccc aag aag ccc tcc aag agc aag cac atc taa	954
Gly Gly Ser Pro Lys Lys Pro Ser Lys Ser Lys His Ile	
305 310 315	

61

&lt;210&gt; 34

&lt;211&gt; 317

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mortierella alpina

&lt;400&gt; 34

Met Ala Ala Ala Ile Leu Asp Lys Val Asn Phe Gly Ile Asp Gln Pro  
 1 5 10 15

Phe Gly Ile Lys Leu Asp Thr Tyr Phe Ala Gln Ala Tyr Glu Leu Val  
 20 25 30

Thr Gly Lys Ser Ile Asp Ser Phe Val Phe Gln Glu Gly Val Thr Pro  
 35 40 45

Leu Ser Thr Gln Arg Glu Val Ala Met Trp Thr Ile Thr Tyr Phe Val  
 50 55 60

Val Ile Phe Gly Gly Arg Gln Ile Met Lys Ser Gln Asp Ala Phe Lys  
 65 70 75 80

Leu Lys Pro Leu Phe Ile Leu His Asn Phe Leu Leu Thr Ile Ala Ser  
 85 90 95

Gly Ser Leu Leu Leu Phe Ile Glu Asn Leu Val Pro Ile Leu Ala  
 100 105 110

Arg Asn Gly Leu Phe Tyr Ala Ile Cys Asp Asp Gly Ala Trp Thr Gln  
 115 120 125

Arg Leu Glu Leu Leu Tyr Tyr Leu Asn Tyr Leu Val Lys Tyr Trp Glu  
 130 135 140

Leu Ala Asp Thr Val Phe Leu Val Leu Lys Lys Lys Pro Leu Glu Phe  
 145 150 155 160

Leu His Tyr Phe His His Ser Met Thr Met Val Leu Cys Phe Val Gln  
 165 170 175

Leu Gly Gly Tyr Thr Ser Val Ser Trp Val Pro Ile Thr Leu Asn Leu  
 180 185 190

Thr Val His Val Phe Met Tyr Tyr Tyr Tyr Met Arg Ser Ala Ala Gly  
 195 200 205

Val Arg Ile Trp Trp Lys Gln Tyr Leu Thr Thr Leu Gln Ile Val Gln  
 210 215 220

## 62

Phe Val Leu Asp Leu Gly Phe Ile Tyr Phe Cys Ala Tyr Thr Tyr Phe  
 225 230 235 240

Ala Phe Thr Tyr Phe Pro Trp Ala Pro Asn Val Gly Lys Cys Ala Gly  
 245 250 255

Thr Glu Gly Ala Ala Leu Phe Gly Cys Gly Leu Leu Ser Ser Tyr Leu  
 260 265 270

Leu Leu Phe Ile Asn Phe Tyr Arg Ile Thr Tyr Asn Ala Lys Ala Lys  
 275 280 285

Ala Ala Lys Glu Arg Gly Ser Asn Phe Thr Pro Lys Thr Val Lys Ser  
 290 295 300

Gly Gly Ser Pro Lys Lys Pro Ser Lys Ser Lys His Ile  
 305 310 315

<210> 35

<211> 957

<212> DNA

<213> Mortierella alpina

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(957)

<223> Delta-6-Elongase

<400> 35

atg gag tcg att gcg cca ttc ctc cca tca aag atg ccg caa gat ctg 48  
 Met Glu Ser Ile Ala Pro Phe Leu Pro Ser Lys Met Pro Gln Asp Leu  
 1 5 10 15

ttt atg gac ctt gcc acc gct atc ggt gtc cgg gcc gcg ccc tat gtc 96  
 Phe Met Asp Leu Ala Thr Ala Ile Gly Val Arg Ala Ala Pro Tyr Val  
 20 25 30

gat cct ctc gag gcc gcg ctg gtg gcc cag gcc gag aag tac atc ccc 144  
 Asp Pro Leu Glu Ala Ala Leu Val Ala Gln Ala Glu Lys Tyr Ile Pro  
 35 40 45

acg att gtc cat cac acg cgt ggg ttc ctg gtc gcg gtg gag tcg cct 192  
 Thr Ile Val His His Thr Arg Gly Phe Leu Val Ala Val Glu Ser Pro  
 50 55 60

ttg gcc cgt gag ctg ccg ttg atg aac ccg ttc cac gtg ctg ttg atc 240  
 Leu Ala Arg Glu Leu Pro Leu Met Asn Pro Phe His Val Leu Leu Ile  
 65 70 75 80

gtg ctc gct tat ttg gtc acg gtc ttt gtg ggc atg cag atc atg aag 288  
 Val Leu Ala Tyr Leu Val Thr Val Phe Val Gly Met Gln Ile Met Lys  
 85 90 95

aac ttt gag cgg ttc gag gtc aag acg ttt tcg ctc ctg cac aac ttt Asn Phe Glu Arg Phe Glu Val Lys Thr Phe Ser Leu Leu His Asn Phe 100 105 110	336
tgt ctg gtc tcg atc agc gcc tac atg tgc ggt ggg atc ctg tac gag Cys Leu Val Ser Ile Ser Ala Tyr Met Cys Gly Gly Ile Leu Tyr Glu 115 120 125	384
gct tat cag gcc aac tat gga ctg ttt gag aac gct gct gat cat acc Ala Tyr Gln Ala Asn Tyr Gly Leu Phe Glu Asn Ala Ala Asp His Thr 130 135 140	432
ttc aag ggt ctt cct atg gcc aag atg atc tgg ctc ttc tac ttc tcc Phe Lys Gly Leu Pro Met Ala Lys Met Ile Trp Leu Phe Tyr Phe Ser 145 150 155 160	480
aag atc atg gag ttt gtc gac acc atg atc atg gtc ctc aag aag aac Lys Ile Met Glu Phe Val Asp Thr Met Ile Met Val Leu Lys Lys Asn 165 170 175	528
aac cgc cag atc tcc ttc ttg cac gtt tac cac cac agc tcc atc ttc Asn Arg Gln Ile Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ser Ser Ile Phe 180 185 190	576
acc atc tgg tgg ttg gtc acc ttt gtt gca ccc aac ggt gaa gcc tac Thr Ile Trp Trp Leu Val Thr Phe Val Ala Pro Asn Gly Glu Ala Tyr 195 200 205	624
ttc tct gct gcg ttg aac tcg ttc atc cat gtg atc atg tac ggc tac Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Phe Ile His Val Ile Met Tyr Gly Tyr 210 215 220	672
tac ttc ttg tcg gcc ttg ggc ttc aag cag gtg tcg ttc atc aag ttc Tyr Phe Leu Ser Ala Leu Gly Phe Lys Gln Val Ser Phe Ile Lys Phe 225 230 235 240	720
tac atc acg cgc tcg cag atg aca cag ttc tgc atg atg tcg gtc cag Tyr Ile Thr Arg Ser Gln Met Thr Gln Phe Cys Met Met Ser Val Gln 245 250 255	768
tct tcc tgg gac atg tac gcc atg aag gtc ctt ggc cgc ccc gga tac Ser Ser Trp Asp Met Tyr Ala Met Lys Val Leu Gly Arg Pro Gly Tyr 260 265 270	816
ccc ttc ttc atc acg gct ctg ctt tgg ttc tac atg tgg acc atg ctc Pro Phe Phe Ile Thr Ala Leu Leu Trp Phe Tyr Met Trp Thr Met Leu 275 280 285	864
ggt ctc ttc tac aac ttt tac aga aag aac gcc aag ttg gcc aag cag Gly Leu Phe Tyr Asn Phe Tyr Arg Lys Asn Ala Lys Leu Ala Lys Gln 290 295 300	912
gcc aag gcc gac gct gcc aag gag aag gca agg aag ttg cag taa Ala Lys Ala Asp Ala Ala Lys Glu Lys Ala Arg Lys Leu Gln 305 310 315	957

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 318

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Mortierella alpina

&lt;400&gt; 36

Met Glu Ser Ile Ala Pro Phe Leu Pro Ser Lys Met Pro Gln Asp Leu  
 1 5 10 15

Phe Met Asp Leu Ala Thr Ala Ile Gly Val Arg Ala Ala Pro Tyr Val  
 20 25 30

Asp Pro Leu Glu Ala Ala Leu Val Ala Gln Ala Glu Lys Tyr Ile Pro  
 35 40 45

Thr Ile Val His His Thr Arg Gly Phe Leu Val Ala Val Glu Ser Pro  
 50 55 60

Leu Ala Arg Glu Leu Pro Leu Met Asn Pro Phe His Val Leu Leu Ile  
 65 70 75 80

Val Leu Ala Tyr Leu Val Thr Val Phe Val Gly Met Gln Ile Met Lys  
 85 90 95

Asn Phe Glu Arg Phe Glu Val Lys Thr Phe Ser Leu Leu His Asn Phe  
 100 105 110

Cys Leu Val Ser Ile Ser Ala Tyr Met Cys Gly Gly Ile Leu Tyr Glu  
 115 120 125

Ala Tyr Gln Ala Asn Tyr Gly Leu Phe Glu Asn Ala Ala Asp His Thr  
 130 135 140

Phe Lys Gly Leu Pro Met Ala Lys Met Ile Trp Leu Phe Tyr Phe Ser  
 145 150 155 160

Lys Ile Met Glu Phe Val Asp Thr Met Ile Met Val Leu Lys Lys Asn  
 165 170 175

Asn Arg Gln Ile Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ser Ser Ile Phe  
 180 185 190

Thr Ile Trp Trp Leu Val Thr Phe Val Ala Pro Asn Gly Glu Ala Tyr  
 195 200 205

Phe Ser Ala Ala Leu Asn Ser Phe Ile His Val Ile Met Tyr Gly Tyr  
 210 215 220

Tyr Phe Leu Ser Ala Leu Gly Phe Lys Gln Val Ser Phe Ile Lys Phe  
 225 230 235 240

Tyr Ile Thr Arg Ser Gln Met Thr Gln Phe Cys Met Met Ser Val Gln  
 245 250 255

Ser Ser Trp Asp Met Tyr Ala Met Lys Val Leu Gly Arg Pro Gly Tyr  
 260 265 270





## 66

Leu Phe Met Ala Ser Lys Leu Phe Glu Leu Val Asp Thr Ile Phe Leu  
 130 135 140

gtt ctc cgt aaa cgt cca ctc atg ttc ctt cac tgg tat cac cat att 480  
 Val Leu Arg Lys Arg Pro Leu Met Phe Leu His Trp Tyr His His Ile  
 145 150 155 160

ctc acc atg atc tac gcc tgg tac tct cat cca ttg acc cca gga ttc 528  
 Leu Thr Met Ile Tyr Ala Trp Tyr Ser His Pro Leu Thr Pro Gly Phe  
 165 170 175

aac aga tac gga att tat ctt aac ttt gtc gtc cac gcc ttc atg tac 576  
 Asn Arg Tyr Gly Ile Tyr Leu Asn Phe Val Val His Ala Phe Met Tyr  
 180 185 190

tct tac tac ttc ctt cgc tcg atg aag att cgc gtg cca gga ttc atc 624  
 Ser Tyr Tyr Phe Leu Arg Ser Met Lys Ile Arg Val Pro Gly Phe Ile  
 195 200 205

gcc caa gct atc aca tct ctt caa atc gtt caa ttc atc atc tct tgc 672  
 Ala Gln Ala Ile Thr Ser Leu Gln Ile Val Gln Phe Ile Ile Ser Cys  
 210 215 220

gcc gtt ctt gct cat ctt ggt tat ctc atg cac ttc acc aat gcc aac 720  
 Ala Val Leu Ala His Leu Gly Tyr Leu Met His Phe Thr Asn Ala Asn  
 225 230 235 240

tgt gat ttc gag cca tca gta ttc aag ctc gca gtt ttc atg gac aca 768  
 Cys Asp Phe Glu Pro Ser Val Phe Lys Leu Ala Val Phe Met Asp Thr  
 245 250 255

aca tac ttg gct ctt ttc gtc aac ttc ttc ctc caa tca tat gtt ctc 816  
 Thr Tyr Leu Ala Leu Phe Val Asn Phe Phe Leu Gln Ser Tyr Val Leu  
 260 265 270

cgc gga gga aaa gac aag tac aag gca gtg cca aag aag aag aac aac 864  
 Arg Gly Gly Lys Asp Lys Tyr Lys Ala Val Pro Lys Lys Lys Asn Asn  
 275 280 285

taa 867

<210> 38  
 <211> 288  
 <212> PRT  
 <213> Caenorhabditis elegans

<400> 38

Met Ala Gln His Pro Leu Val Gln Arg Leu Leu Asp Val Lys Phe Asp  
 1 5 10 15

Thr Lys Arg Phe Val Ala Ile Ala Thr His Gly Pro Lys Asn Phe Pro  
 20 25 30

Asp Ala Glu Gly Arg Lys Phe Phe Ala Asp His Phe Asp Val Thr Ile  
 35 40 45

Gln Ala Ser Ile Leu Tyr Met Val Val Val Phe Gly Thr Lys Trp Phe  
 50 55 60

Met Arg Asn Arg Gln Pro Phe Gln Leu Thr Ile Pro Leu Asn Ile Trp  
65 70 75 80

Asn Phe Ile Leu Ala Ala Phe Ser Ile Ala Gly Ala Val Lys Met Thr  
85 90 95

Pro Glu Phe Phe Gly Thr Ile Ala Asn Lys Gly Ile Val Ala Ser Tyr  
100 105 110

Cys Lys Val Phe Asp Phe Thr Lys Gly Glu Asn Gly Tyr Trp Val Trp  
115 120 125

Leu Phe Met Ala Ser Lys Leu Phe Glu Leu Val Asp Thr Ile Phe Leu  
130 135 140

Val Leu Arg Lys Arg Pro Leu Met Phe Leu His Trp Tyr His His Ile  
145 150 155 160

Leu Thr Met Ile Tyr Ala Trp Tyr Ser His Pro Leu Thr Pro Gly Phe  
165 170 175

Asn Arg Tyr Gly Ile Tyr Leu Asn Phe Val Val His Ala Phe Met Tyr  
180 185 190

Ser Tyr Tyr Phe Leu Arg Ser Met Lys Ile Arg Val Pro Gly Phe Ile  
195 200 205

Ala Gln Ala Ile Thr Ser Leu Gln Ile Val Gln Phe Ile Ile Ser Cys  
210 215 220

Ala Val Leu Ala His Leu Gly Tyr Leu Met His Phe Thr Asn Ala Asn  
225 230 235 240

Cys Asp Phe Glu Pro Ser Val Phe Lys Leu Ala Val Phe Met Asp Thr  
245 250 255

Thr Tyr Leu Ala Leu Phe Val Asn Phe Phe Leu Gln Ser Tyr Val Leu  
260 265 270

Arg Gly Gly Lys Asp Lys Tyr Lys Ala Val Pro Lys Lys Lys Asn Asn  
275 280 285

&lt;210&gt; 39

&lt;211&gt; 1626

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Euglena gracilis

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1626)

&lt;223&gt; Delta-4-Desaturase

&lt;400&gt; 39

atg ttg gtg ctg ttt ggc aat ttc tat gtc aag caa tac tcc caa aag	48
Met Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Val Lys Gln Tyr Ser Gln Lys	
1 5 10 15	
aac ggc aag ccg gag aac gga gcc acc cct gag aac gga gcg aag ccg	96
Asn Gly Lys Pro Glu Asn Gly Ala Thr Pro Glu Asn Gly Ala Lys Pro	
20 25 30	
caa cct tgc gag aac ggc acg gtg gaa aag cga gag aat gac acc gcc	144
Gln Pro Cys Glu Asn Gly Thr Val Glu Lys Arg Glu Asn Asp Thr Ala	
35 40 45	
aac gtt cgg ccc acc cgt cca gct gga ccc ccg ccg gcc acg tac tac	192
Asn Val Arg Pro Thr Arg Pro Ala Gly Pro Pro Pro Ala Thr Tyr Tyr	
50 55 60	
gac tcc ctg gca gtg tcg ggg cag ggc aag gag cgg ctg ttc acc acc	240
Asp Ser Leu Ala Val Ser Gly Gln Gly Lys Glu Arg Leu Phe Thr Thr	
65 70 75 80	
gat gag gtg agg cgg cac atc ctc ccc acc gat ggc tgg ctg acg tgc	288
Asp Glu Val Arg Arg His Ile Leu Pro Thr Asp Gly Trp Leu Thr Cys	
85 90 95	
cac gaa gga gtc tac gat gtc act gat ttc ctt gcc aag cac cct ggt	336
His Glu Gly Val Tyr Asp Val Thr Asp Phe Leu Ala Lys His Pro Gly	
100 105 110	
ggc ggt gtc atc acg ctg ggc ctt gga agg gac tgc aca atc ctc atc	384
Gly Gly Val Ile Thr Leu Gly Leu Gly Arg Asp Cys Thr Ile Leu Ile	
115 120 125	
gag tca tac cac cct gct ggg cgc ccg gac aag gtg atg gag aag tac	432
Glu Ser Tyr His Pro Ala Gly Arg Pro Asp Lys Val Met Glu Lys Tyr	
130 135 140	
cgc att ggt acg ctg cag gac ccc aag acg ttc tat gct tgg gga gag	480
Arg Ile Gly Thr Leu Gln Asp Pro Lys Thr Phe Tyr Ala Trp Gly Glu	
145 150 155 160	
tcc gat ttc tac cct gag ttg aag cgc cgg gcc ctt gca agg ctg aag	528
Ser Asp Phe Tyr Pro Glu Leu Lys Arg Arg Ala Leu Ala Arg Leu Lys	
165 170 175	
gag gct ggt cag gcg cgg cgc ggc ggc ctt ggg gtg aag gcc ctc ctg	576
Glu Ala Gly Gln Ala Arg Arg Gly Gly Leu Gly Val Lys Ala Leu Leu	
180 185 190	
gtg ctc acc ctc ttc ttc gtg tcg tgg tac atg tgg gtg gcc cac aag	624
Val Leu Thr Leu Phe Phe Val Ser Trp Tyr Met Trp Val Ala His Lys	
195 200 205	
tcc ttc ctc tgg gcc gcc gtc tgg ggc ttc gcc ggc tcc cac gtc ggg	672
Ser Phe Leu Trp Ala Ala Val Trp Gly Phe Ala Gly Ser His Val Gly	
210 215 220	
ctg agc atc cag cac gat ggc aac cac ggc gcg ttc agc cgc aac aca	720

## 69

Leu Ser Ile Gln His Asp Gly Asn His Gly Ala Phe Ser Arg Asn Thr	
225	230 235 240
ctg gtg aac cgc ctg gcg ggg tgg ggc atg gac ttg atc ggc gcg tcg	768
Leu Val Asn Arg Leu Ala Gly Trp Gly Met Asp Leu Ile Gly Ala Ser	
245	250 255
tcc acg gtg tgg gag tac cag cac gtc atc ggc cac cac cag tac acc	816
Ser Thr Val Trp Glu Tyr Gln His Val Ile Gly His His Gln Tyr Thr	
260	265 270
aac ctc gtg tcg gac acg cta ttc agt ctg cct gag aac gat ccg gac	864
Asn Leu Val Ser Asp Thr Leu Phe Ser Leu Pro Glu Asn Asp Pro Asp	
275	280 285
gtc ttc tcc agc tac ccg ctg atg cgc atg cac ccg gat acg gcg tgg	912
Val Phe Ser Ser Tyr Pro Leu Met Arg Met His Pro Asp Thr Ala Trp	
290	295 300
cag ccg cac cac cgc ttc cag cac ctg ttc gcg ttc cca ctg ttc gcc	960
Gln Pro His His Arg Phe Gln His Leu Phe Ala Phe Pro Leu Phe Ala	
305	310 315 320
ctg atg aca atc agc aag gtg ctg acc agc gat ttc gct gtc tgc ctc	1008
Leu Met Thr Ile Ser Lys Val Leu Thr Ser Asp Phe Ala Val Cys Leu	
325	330 335
agc atg aag aag ggg tcc atc gac tgc tcc tcc agg ctc gtc cca ctg	1056
Ser Met Lys Lys Gly Ser Ile Asp Cys Ser Ser Arg Leu Val Pro Leu	
340	345 350
gag ggg cag ctg ctg ttc tgg ggg gcc aag ctg gcg aac ttc ctg ttg	1104
Glu Gly Gln Leu Leu Phe Trp Gly Ala Lys Leu Ala Asn Phe Leu Leu	
355	360 365
cag att gtg ttg cca tgc tac ctc cac ggg aca gct atg ggc ctg gcc	1152
Gln Ile Val Leu Pro Cys Tyr Leu His Gly Thr Ala Met Gly Leu Ala	
370	375 380
ctc ttc tct gtt gct cac ctt gtg tgc ggg gag tac ctc gcg atc tgc	1200
Leu Phe Ser Val Ala His Leu Val Ser Gly Glu Tyr Leu Ala Ile Cys	
385	390 395 400
ttc atc atc aac cac atc agc gag tct tgt gag ttt atg aat aca agc	1248
Phe Ile Ile Asn His Ile Ser Glu Ser Cys Glu Phe Met Asn Thr Ser	
405	410 415
ttt caa acc gcc gcc cgg agg aca gag atg ctt cag gca gca cat cag	1296
Phe Gln Thr Ala Ala Arg Arg Thr Glu Met Leu Gln Ala Ala His Gln	
420	425 430
gca gcg gag gcc aag aag gtg aag ccc acc cct cca ccg aac gat tgg	1344
Ala Ala Glu Ala Lys Lys Val Lys Pro Thr Pro Pro Pro Asn Asp Trp	
435	440 445
gct gtg aca cag gtc caa tgc tgc gtg aat tgg aga tca ggt ggc gtg	1392
Ala Val Thr Gln Val Gln Cys Cys Val Asn Trp Arg Ser Gly Gly Val	
450	455 460
ttg gcc aat cac ctc tct gga ggc ttg aac cac cag atc gag cat cat	1440
Leu Ala Asn His Leu Ser Gly Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His	
465	470 475 480
ctg ttc ccc agc atc tcg cat gcc aac tac ccc acc atc gcc cct gtt	1488
Leu Phe Pro Ser Ile Ser His Ala Asn Tyr Pro Thr Ile Ala Pro Val	
485	490 495
gtg aag gag gtg tgc gag gag tac ggg ttg ccg tac aag aat tac gtc	1536

## 70

Val Lys Glu Val Cys Glu Glu Tyr Gly Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr Val  
 500 505 510  
 acg ttc tgg gat gca gtc tgt ggc atg gtt cag cac ctc cgg ttg atg 1584  
 Thr Phe Trp Asp Ala Val Cys Gly Met Val Gln His Leu Arg Leu Met  
 515 520 525  
 ggt gct cca ccg gtg cca acg aac ggg gac aaa aag tca taa 1626  
 Gly Ala Pro Pro Val Pro Thr Asn Gly Asp Lys Lys Ser  
 530 535 540

&lt;210&gt; 40

&lt;211&gt; 541

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Euglena gracilis

&lt;400&gt; 40

Met Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Val Lys Gln Tyr Ser Gln Lys  
 1 5 10 15

Asn Gly Lys Pro Glu Asn Gly Ala Thr Pro Glu Asn Gly Ala Lys Pro  
 20 25 30

Gln Pro Cys Glu Asn Gly Thr Val Glu Lys Arg Glu Asn Asp Thr Ala  
 35 40 45

Asn Val Arg Pro Thr Arg Pro Ala Gly Pro Pro Pro Ala Thr Tyr Tyr  
 50 55 60

Asp Ser Leu Ala Val Ser Gly Gln Gly Lys Glu Arg Leu Phe Thr Thr  
 65 70 75 80

Asp Glu Val Arg Arg His Ile Leu Pro Thr Asp Gly Trp Leu Thr Cys  
 85 90 95

His Glu Gly Val Tyr Asp Val Thr Asp Phe Leu Ala Lys His Pro Gly  
 100 105 110

Gly Gly Val Ile Thr Leu Gly Leu Gly Arg Asp Cys Thr Ile Leu Ile  
 115 120 125

Glu Ser Tyr His Pro Ala Gly Arg Pro Asp Lys Val Met Glu Lys Tyr  
 130 135 140

Arg Ile Gly Thr Leu Gln Asp Pro Lys Thr Phe Tyr Ala Trp Gly Glu  
 145 150 155 160

Ser Asp Phe Tyr Pro Glu Leu Lys Arg Arg Ala Leu Ala Arg Leu Lys  
 165 170 175

## 71

Glu Ala Gly Gln Ala Arg Arg Gly Gly Leu Gly Val Lys Ala Leu Leu  
 180 185 190

Val Leu Thr Leu Phe Phe Val Ser Trp Tyr Met Trp Val Ala His Lys  
 195 200 205

Ser Phe Leu Trp Ala Ala Val Trp Gly Phe Ala Gly Ser His Val Gly  
 210 215 220

Leu Ser Ile Gln His Asp Gly Asn His Gly Ala Phe Ser Arg Asn Thr  
 225 230 235 240

Leu Val Asn Arg Leu Ala Gly Trp Gly Met Asp Leu Ile Gly Ala Ser  
 245 250 255

Ser Thr Val Trp Glu Tyr Gln His Val Ile Gly His His Gln Tyr Thr  
 260 265 270

Asn Leu Val Ser Asp Thr Leu Phe Ser Leu Pro Glu Asn Asp Pro Asp  
 275 280 285

Val Phe Ser Ser Tyr Pro Leu Met Arg Met His Pro Asp Thr Ala Trp  
 290 295 300

Gln Pro His His Arg Phe Gln His Leu Phe Ala Phe Pro Leu Phe Ala  
 305 310 315 320

Leu Met Thr Ile Ser Lys Val Leu Thr Ser Asp Phe Ala Val Cys Leu  
 325 330 335

Ser Met Lys Lys Gly Ser Ile Asp Cys Ser Ser Arg Leu Val Pro Leu  
 340 345 350

Glu Gly Gln Leu Leu Phe Trp Gly Ala Lys Leu Ala Asn Phe Leu Leu  
 355 360 365

Gln Ile Val Leu Pro Cys Tyr Leu His Gly Thr Ala Met Gly Leu Ala  
 370 375 380

Leu Phe Ser Val Ala His Leu Val Ser Gly Glu Tyr Leu Ala Ile Cys  
 385 390 395 400

Phe Ile Ile Asn His Ile Ser Glu Ser Cys Glu Phe Met Asn Thr Ser  
 405 410 415

Phe Gln Thr Ala Ala Arg Arg Thr Glu Met Leu Gln Ala Ala His Gln  
 420 425 430

Ala Ala Glu Ala Lys Lys Val Lys Pro Thr Pro Pro Pro Asn Asp Trp  
 435 440 445

## 72

Ala Val Thr Gln Val Gln Cys Cys Val Asn Trp Arg Ser Gly Gly Val  
 450 455 460

Leu Ala Asn His Leu Ser Gly Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His  
 465 470 475 480

Leu Phe Pro Ser Ile Ser His Ala Asn Tyr Pro Thr Ile Ala Pro Val  
 485 490 495

Val Lys Glu Val Cys Glu Glu Tyr Gly Leu Pro Tyr Lys Asn Tyr Val  
 500 505 510

Thr Phe Trp Asp Ala Val Cys Gly Met Val Gln His Leu Arg Leu Met  
 515 520 525

Gly Ala Pro Pro Val Pro Thr Asn Gly Asp Lys Lys Ser  
 530 535 540

<210> 41

<211> 1548

<212> DNA

<213> Thraustochytrium

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1548)

<223> Delta-4-Desaturase

<400> 41

atg acg gtc ggg ttt gac gaa acg gtg act atg gac acg gtc cgc aac 48  
 Met Thr Val Gly Phe Asp Glu Thr Val Thr Met Asp Thr Val Arg Asn  
 1 5 10 15

cac aac atg ccg gac gac gcc tgg tgc gcg atc cac ggc acc gtg tac 96  
 His Asn Met Pro Asp Asp Ala Trp Cys Ala Ile His Gly Thr Val Tyr  
 20 25 30

gac atc acc aag ttc agc aag gtg cac ccc ggc ggg gac atc atc atg 144  
 Asp Ile Thr Lys Phe Ser Lys Val His Pro Gly Gly Asp Ile Ile Met  
 35 40 45

ctg gcc gct ggc aag gag gcc acc atc ctg ttc gag acc tac cac atc 192  
 Leu Ala Ala Gly Lys Glu Ala Thr Ile Leu Phe Glu Thr Tyr His Ile  
 50 55 60

aag ggc gtc ccg gac gcg gtg ctg cgc aag tac aag gtc ggc aag ctc 240  
 Lys Gly Val Pro Asp Ala Val Leu Arg Lys Tyr Lys Val Gly Lys Leu  
 65 70 75 80

ccc cag ggc aag aag ggc gaa acg agc cac atg ccc acc ggg ctc gac 288  
 Pro Gln Gly Lys Lys Gly Glu Thr Ser His Met Pro Thr Gly Leu Asp  
 85 90 95

tcg gcc tcc tac tac tcg tgg gac agc gag ttt tac agg gtg ctc cgc Ser Ala Ser Tyr Tyr Ser Trp Asp Ser Glu Phe Tyr Arg Val Leu Arg 100 105 110	336
gag cgc gtc gcc aag aag ctg gcc gag ccc gcc ctc atg cag cgc gcg Glu Arg Val Ala Lys Lys Leu Ala Glu Pro Gly Leu Met Gln Arg Ala 115 120 125	384
cgc atg gag ctc tgg gcc aag gcg atc ttc ctc ctg gca ggt ttc tgg Arg Met Glu Leu Trp Ala Lys Ala Ile Phe Leu Leu Ala Gly Phe Trp 130 135 140	432
ggc tcc ctt tac gcc atg tgc gtg cta gac ccg cac gcc ggt gcc atg Gly Ser Leu Tyr Ala Met Cys Val Leu Asp Pro His Gly Gly Ala Met 145 150 155 160	480
gta gcc gcc gtt acg ctc gcc gtg ttc gct gcc ttt gtc gga act tgc Val Ala Ala Val Thr Leu Gly Val Phe Ala Ala Phe Val Gly Thr Cys 165 170 175	528
atc cag cac gac gcc agc cac gcc gcc ttc tcc aag tcg cga ttc atg Ile Gln His Asp Gly Ser His Gly Ala Phe Ser Lys Ser Arg Phe Met 180 185 190	576
aac aag gcg gcg gcc tgg acc ctc gac atg atc gcc gcg agt gcg atg Asn Lys Ala Ala Gly Trp Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Met 195 200 205	624
acc tgg gag atg cag cac gtt ctt gcc cac cac ccg tac acc aac ctc Thr Trp Glu Met Gln His Val Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Leu 210 215 220	672
atc gag atg gag aac ggt ttg gcc aag gtc aag gcc gcc gac gtc gac Ile Glu Met Glu Asn Gly Leu Ala Lys Val Lys Gly Ala Asp Val Asp 225 230 235 240	720
ccg aag aag gtc gac cag gag agc gac ccg gac gtc ttc agt acg tac Pro Lys Lys Val Asp Gln Glu Ser Asp Pro Asp Val Phe Ser Thr Tyr 245 250 255	768
ccg atg ctt cgc ctg cac ccg tgg cac cgc cag ccg ttt tac cac aag Pro Met Leu Arg Leu His Pro Trp His Arg Gln Arg Phe Tyr His Lys 260 265 270	816
ttc cag cac ctg tac gcc ccg ttt atc ttt ggg tct atg acg att aac Phe Gln His Leu Tyr Ala Pro Phe Ile Phe Gly Ser Met Thr Ile Asn 275 280 285	864
aag gtg att tcc cag gat gtc ggg gtt gtg ctg cgc aag cgc ctg ttc Lys Val Ile Ser Gln Asp Val Gly Val Val Leu Arg Lys Arg Leu Phe 290 295 300	912
cag atc gac gcc aac tgc cgg tat gcc agc ccc tgg tac gtg gcc cgc Gln Ile Asp Ala Asn Cys Arg Tyr Gly Ser Pro Trp Tyr Val Ala Arg 305 310 315 320	960
ttc tgg atc atg aag ctc ctc acc acg ctc tac atg gtg gcg ctt ccc Phe Trp Ile Met Lys Leu Leu Thr Thr Leu Tyr Met Val Ala Leu Pro 325 330 335	1008
atg tac atg cag ggg cct gct cag gcc ttg aag ctt ttc ttc atg gcc Met Tyr Met Gln Gly Pro Ala Gln Gly Leu Lys Leu Phe Phe Met Ala 340 345 350	1056
cac ttc acc tgc gga gag gtc ctc gcc acc atg ttt att gtc aac cac His Phe Thr Cys Gly Glu Val Leu Ala Thr Met Phe Ile Val Asn His 355 360 365	1104



atc atc gag ggc gtc agc tac gct tcc aag gac gcg gtc aag ggc gtc 1152  
 Ile Ile Glu Gly Val Ser Tyr Ala Ser Lys Asp Ala Val Lys Gly Val  
 370 375 380

atg gct ccg ccg cgc act gtg cac ggt gtc acc ccg atg cag gtg acg 1200  
 Met Ala Pro Pro Arg Thr Val His Gly Val Thr Pro Met Gln Val Thr  
 385 390 395 400

caa aag gcg ctc agt gcg gcc gag tcg gcc aag tcg gac gcc gac aag 1248  
 Gln Lys Ala Leu Ser Ala Ala Glu Ser Ala Lys Ser Asp Ala Asp Lys  
 405 410 415

acg acc atg atc ccc ctc aac gac tgg gcc gct gtg cag tgc cag acc 1296  
 Thr Thr Met Ile Pro Leu Asn Asp Trp Ala Ala Val Gln Cys Gln Thr  
 420 425 430

tct gtg aac tgg gct gtc ggg tcg tgg ttt tgg aac cac ttt tcg ggc 1344  
 Ser Val Asn Trp Ala Val Gly Ser Trp Phe Trp Asn His Phe Ser Gly  
 435 440 445

ggc ctc aac cac cag att gag cac cac tgc ttc ccc caa aac ccc cac 1392  
 Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His Cys Phe Pro Gln Asn Pro His  
 450 455 460

acg gtc aac gtc tac atc tcg ggc atc gtc aag gag acc tgc gaa gaa 1440  
 Thr Val Asn Val Tyr Ile Ser Gly Ile Val Lys Glu Thr Cys Glu Glu  
 465 470 475 480

tac ggc gtg ccg tac cag gct gag atc agc ctc ttc tct gcc tat ttc 1488  
 Tyr Gly Val Pro Tyr Gln Ala Glu Ile Ser Leu Phe Ser Ala Tyr Phe  
 485 490 495

aag atg ctg tcg cac ctc cgc acg ctc ggc aac gag gac ctc acg gcc 1536  
 Lys Met Leu Ser His Leu Arg Thr Leu Gly Asn Glu Asp Leu Thr Ala  
 500 505 510

tgg tcc acg tga 1548  
 Trp Ser Thr  
 515

<210> 42  
 <211> 515  
 <212> PRT  
 <213> Thraustochytrium

<400> 42  
 Met Thr Val Gly Phe Asp Glu Thr Val Thr Met Asp Thr Val Arg Asn  
 1 5 10 15  
 His Asn Met Pro Asp Asp Ala Trp Cys Ala Ile His Gly Thr Val Tyr  
 20 25 30  
 Asp Ile Thr Lys Phe Ser Lys Val His Pro Gly Gly Asp Ile Ile Met  
 35 40 45  
 Leu Ala Ala Gly Lys Glu Ala Thr Ile Leu Phe Glu Thr Tyr His Ile  
 50 55 60

Lys Gly Val Pro Asp Ala Val Leu Arg Lys Tyr Lys Val Gly Lys Leu  
65 70 75 80

Pro Gln Gly Lys Lys Gly Glu Thr Ser His Met Pro Thr Gly Leu Asp  
85 90 95

Ser Ala Ser Tyr Tyr Ser Trp Asp Ser Glu Phe Tyr Arg Val Leu Arg  
100 105 110

Glu Arg Val Ala Lys Lys Leu Ala Glu Pro Gly Leu Met Gln Arg Ala  
115 120 125

Arg Met Glu Leu Trp Ala Lys Ala Ile Phe Leu Leu Ala Gly Phe Trp  
130 135 140

Gly Ser Leu Tyr Ala Met Cys Val Leu Asp Pro His Gly Gly Ala Met  
145 150 155 160

Val Ala Ala Val Thr Leu Gly Val Phe Ala Ala Phe Val Gly Thr Cys  
165 170 175

Ile Gln His Asp Gly Ser His Gly Ala Phe Ser Lys Ser Arg Phe Met  
180 185 190

Asn Lys Ala Ala Gly Trp Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Met  
195 200 205

Thr Trp Glu Met Gln His Val Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Leu  
210 215 220

Ile Glu Met Glu Asn Gly Leu Ala Lys Val Lys Gly Ala Asp Val Asp  
225 230 235 240

Pro Lys Lys Val Asp Gln Glu Ser Asp Pro Asp Val Phe Ser Thr Tyr  
245 250 255

Pro Met Leu Arg Leu His Pro Trp His Arg Gln Arg Phe Tyr His Lys  
260 265 270

Phe Gln His Leu Tyr Ala Pro Phe Ile Phe Gly Ser Met Thr Ile Asn  
275 280 285

Lys Val Ile Ser Gln Asp Val Gly Val Val Leu Arg Lys Arg Leu Phe  
290 295 300

Gln Ile Asp Ala Asn Cys Arg Tyr Gly Ser Pro Trp Tyr Val Ala Arg  
305 310 315 320

Phe Trp Ile Met Lys Leu Leu Thr Thr Leu Tyr Met Val Ala Leu Pro  
325 330 335

Met Tyr Met Gln Gly Pro Ala Gln Gly Leu Lys Leu Phe Phe Met Ala  
                   340                                  345                                  350  
  
 His Phe Thr Cys Gly Glu Val Leu Ala Thr Met Phe Ile Val Asn His  
                   355                                  360                                  365  
  
 Ile Ile Glu Gly Val Ser Tyr Ala Ser Lys Asp Ala Val Lys Gly Val  
           370                                  375                                  380  
  
 Met Ala Pro Pro Arg Thr Val His Gly Val Thr Pro Met Gln Val Thr  
   385                                  390                                  395                                  400  
  
 Gln Lys Ala Leu Ser Ala Ala Glu Ser Ala Lys Ser Asp Ala Asp Lys  
                                   405                                  410                                  415  
  
 Thr Thr Met Ile Pro Leu Asn Asp Trp Ala Ala Val Gln Cys Gln Thr  
                   420                                  425                                  430  
  
 Ser Val Asn Trp Ala Val Gly Ser Trp Phe Trp Asn His Phe Ser Gly  
                   435                                  440                                  445  
  
 Gly Leu Asn His Gln Ile Glu His His Cys Phe Pro Gln Asn Pro His  
           450                                  455                                  460  
  
 Thr Val Asn Val Tyr Ile Ser Gly Ile Val Lys Glu Thr Cys Glu Glu  
   465                                  470                                  475                                  480  
  
 Tyr Gly Val Pro Tyr Gln Ala Glu Ile Ser Leu Phe Ser Ala Tyr Phe  
                   485                                  490                                  495  
  
 Lys Met Leu Ser His Leu Arg Thr Leu Gly Asn Glu Asp Leu Thr Ala  
                   500                                  505                                  510  
  
 Trp Ser Thr  
           515

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 960

&lt;212&gt; DNA

<213> *Thalassiosira pseudonana*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1) .. (960)

&lt;223&gt; Delta-5-Elongase

<400> 43  
 atg gtg ttg tac aat gtg gcg caa gtg ctg ctc aat ggg tgg acg gtg 48  
 Met Val Leu Tyr Asn Val Ala Gln Val Leu Leu Asn Gly Trp Thr Val  
 1 5 10 15  
  
 tat gcg att gtg gat gcg gtg atg aat aga gac cat ccg ttt att gga 96  
 Tyr Ala Ile Val Asp Ala Val Met Asn Arg Asp His Pro Phe Ile Gly  
 20 25 30  
  
 agt aga agt ttg gtt ggg gcg gcg ttg cat agt ggg agc tcg tat gcg 144  
 Ser Arg Ser Leu Val Gly Ala Ala Leu His Ser Gly Ser Ser Tyr Ala  
 35 40 45  
  
 gtg tgg gtt cat tat tgt gat aag tat ttg gag ttc ttt gat acg tat 192  
 Val Trp Val His Tyr Cys Asp Lys Tyr Leu Glu Phe Phe Asp Thr Tyr  
 50 55 60  
  
 ttt atg gtg ttg agg ggg aaa atg gac cag atg gta ctt ggt gaa gtt 240  
 Phe Met Val Leu Arg Gly Lys Met Asp Gln Met Val Leu Gly Glu Val  
 65 70 75 80  
  
 ggt ggc agt gtg tgg tgt ggc gtt gga tat atg gat atg gag aag atg 288  
 Gly Gly Ser Val Trp Cys Gly Val Gly Tyr Met Asp Met Glu Lys Met  
 85 90 95  
  
 ata cta ctc agc ttt gga gtg cat cgg tct gct cag gga acg ggg aag 336  
 Ile Leu Leu Ser Phe Gly Val His Arg Ser Ala Gln Gly Thr Gly Lys  
 100 105 110  
  
 gct ttc acc aac aac gtt acc aat cca cat ctc acg ctt cca cct cat 384  
 Ala Phe Thr Asn Asn Val Thr Asn Pro His Leu Thr Leu Pro Pro His  
 115 120 125  
  
 tct aca aaa aca aaa aaa cag gtc tcc ttc ctc cac atc tac cac cac 432  
 Ser Thr Lys Thr Lys Lys Gln Val Ser Phe Leu His Ile Tyr His His  
 130 135 140  
  
 acg acc ata gcg tgg gca tgg tgg atc gcc ctc cgc ttc tcc ccc ggt 480  
 Thr Thr Ile Ala Trp Ala Trp Trp Ile Ala Leu Arg Phe Ser Pro Gly  
 145 150 155 160  
  
 gga gac att tac ttc ggg gca ctc ctc aac tcc atc atc cac gtc ctc 528  
 Gly Asp Ile Tyr Phe Gly Ala Leu Leu Asn Ser Ile Ile His Val Leu  
 165 170 175  
  
 atg tat tcc tac tac gcc ctt gcc cta ctc aag gtc agt tgt cca tgg 576  
 Met Tyr Ser Tyr Tyr Ala Leu Ala Leu Leu Lys Val Ser Cys Pro Trp  
 180 185 190  
  
 aaa cga tac ctg act caa gct caa tta ttg caa ttc aca agt gtg gtg 624  
 Lys Arg Tyr Leu Thr Gln Ala Gln Leu Leu Gln Phe Thr Ser Val Val  
 195 200 205  
  
 gtt tat acg ggg tgt acg ggt tat act cat tac tat cat acg aag cat 672  
 Val Tyr Thr Gly Cys Thr Gly Tyr Thr His Tyr Tyr His Thr Lys His  
 210 215 220  
  
 gga gcg gat gag aca cag cct agt tta gga acg tat tat ttc tgt tgt 720  
 Gly Ala Asp Glu Thr Gln Pro Ser Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Cys Cys  
 225 230 235 240  
  
 gga gtg cag gtg ttt gag atg gtt agt ttg ttt gta ctc ttt tcc atc 768  
 Gly Val Gln Val Phe Glu Met Val Ser Leu Phe Val Leu Phe Ser Ile  
 245 250 255  
  
 ttt tat aaa cga tcc tat tcg aag aag aac aag tca gga gga aag gat 816

## 78

Phe Tyr Lys Arg Ser Tyr Ser Lys Lys Asn Lys Ser Gly Gly Lys Asp  
                   260                                  265                                  270  
 agc aag aag aat gat gat ggg aat aat gag gat caa tgt cac aag gct 864  
 Ser Lys Lys Asn Asp Asp Gly Asn Asn Glu Asp Gln Cys His Lys Ala  
                   275                                  280                                  285  
 atg aag gat ata tcg gag ggt gcg aag gag gtt gtg ggg cat gca gcg 912  
 Met Lys Asp Ile Ser Glu Gly Ala Lys Glu Val Val Gly His Ala Ala  
                   290                                  295                                  300  
 aag gat gct gga aag ttg gtg gct acg aga gta agg tgt aag gtg taa 960  
 Lys Asp Ala Gly Lys Leu Val Ala Thr Arg Val Arg Cys Lys Val  
                   305                                  310                                  315

&lt;210&gt; 44

&lt;211&gt; 319

&lt;212&gt; PRT

<213> *Thalassiosira pseudonana*

&lt;400&gt; 44

Met Val Leu Tyr Asn Val Ala Gln Val Leu Leu Asn Gly Trp Thr Val  
 1                  5                                  10                                  15

Tyr Ala Ile Val Asp Ala Val Met Asn Arg Asp His Pro Phe Ile Gly  
                   20                                  25                                  30

Ser Arg Ser Leu Val Gly Ala Ala Leu His Ser Gly Ser Ser Tyr Ala  
                   35                                  40                                  45

Val Trp Val His Tyr Cys Asp Lys Tyr Leu Glu Phe Phe Asp Thr Tyr  
                   50                                  55                                  60

Phe Met Val Leu Arg Gly Lys Met Asp Gln Met Val Leu Gly Glu Val  
                   65                                  70                                  75                                  80

Gly Gly Ser Val Trp Cys Gly Val Gly Tyr Met Asp Met Glu Lys Met  
                   85                                  90                                  95

Ile Leu Leu Ser Phe Gly Val His Arg Ser Ala Gln Gly Thr Gly Lys  
                   100                                  105                                  110

Ala Phe Thr Asn Asn Val Thr Asn Pro His Leu Thr Leu Pro Pro His  
                   115                                  120                                  125

Ser Thr Lys Thr Lys Lys Gln Val Ser Phe Leu His Ile Tyr His His  
                   130                                  135                                  140

Thr Thr Ile Ala Trp Ala Trp Trp Ile Ala Leu Arg Phe Ser Pro Gly  
                   145                                  150                                  155                                  160

79

Gly Asp Ile Tyr Phe Gly Ala Leu Leu Asn Ser Ile Ile His Val Leu  
 165 170 175

Met. Tyr Ser Tyr Tyr Ala Leu Ala Leu Leu Lys Val Ser Cys Pro Trp  
 180 185 190

Lys Arg Tyr Leu Thr Gln Ala Gln Leu Leu Gln Phe Thr Ser Val Val  
 195 200 205

Val Tyr Thr Gly Cys Thr Gly Tyr Thr His Tyr Tyr His Thr Lys His  
 210 215 220

Gly Ala Asp Glu Thr Gln Pro Ser Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Cys Cys  
 225 230 235 240

Gly Val Gln Val Phe Glu Met Val Ser Leu Phe Val Leu Phe Ser Ile  
 245 250 255

Phe Tyr Lys Arg Ser Tyr Ser Lys Lys Asn Lys Ser Gly Gly Lys Asp  
 260 265 270

Ser Lys Lys Asn Asp Asp Gly Asn Asn Glu Asp Gln Cys His Lys Ala  
 275 280 285

Met Lys Asp Ile Ser Glu Gly Ala Lys Glu Val Val Gly His Ala Ala  
 290 295 300

Lys Asp Ala Gly Lys Leu Val Ala Thr Arg Val Arg Cys Lys Val  
 305 310 315

&lt;210&gt; . 45

&lt;211&gt; 819

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Thalassiosira pseudonana

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(819)

&lt;223&gt; Delta-5-Elongase

&lt;400&gt; 45

atg gac gcc tac aac gct gca atg gat aag atc ggt gcc gcc atc atc  
 Met Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Met Asp Lys Ile Gly Ala Ala Ile Ile  
 1 5 10 15

48

gat tgg tct gat ccc gat gga aag ttc cgt gcc gat aga gag gac tgg  
 Asp Trp Ser Asp Pro Asp Gly Lys Phe Arg Ala Asp Arg Glu Asp Trp  
 20 25 30

96

tgg ctc tgc gac ttc cgt agc gcc atc acc atc gcc ctc atc tac atc Trp Leu Cys Asp Phe Arg Ser Ala Ile Thr Ile Ala Leu Ile Tyr Ile 35 40 45	144
gcc ttc gtc atc ctc ggt tcc gcc gtc atg caa tcc ctc ccc gca atg Ala Phe Val Ile Leu Gly Ser Ala Val Met Gln Ser Leu Pro Ala Met 50 55 60	192
gat ccc tac ccc atc aaa ttc ctc tac aac gtc tcc caa atc ttc ctt Asp Pro Tyr Pro Ile Lys Phe Leu Tyr Asn Val Ser Gln Ile Phe Leu 65 70 75 80	240
tgt gcc tac atg act gtc gag gcg gga ttt ttg gcc tac cgc aat gga Cys Ala Tyr Met Thr Val Glu Ala Gly Phe Leu Ala Tyr Arg Asn Gly 85 90 95	288
tat acc gtc atg cct tgc aat cat ttc aat gtg aat gat cct ccc gtg Tyr Thr Val Met Pro Cys Asn His Phe Asn Val Asn Asp Pro Pro Val 100 105 110	336
gcg aat ctt ctt tgg ttg ttt tat att tcc aag gtg tgg gac ttt tgg Ala Asn Leu Leu Trp Leu Phe Tyr Ile Ser Lys Val Trp Asp Phe Trp 115 120 125	384
gat acc att ttc att gtg ttg ggg aag aag tgg cgt caa tta tct ttc Asp Thr Ile Phe Ile Val Leu Gly Lys Lys Trp Arg Gln Leu Ser Phe 130 135 140	432
ttg cat gta tac cat cac acc acc atc ttt cta ttc tat tgg ctg aat Leu His Val Tyr His Thr Thr Ile Phe Leu Phe Tyr Trp Leu Asn 145 150 155 160	480
gcc aat gtc ttg tac gat ggt gac atc ttc ctt acc atc ttg ctc aat Ala Asn Val Leu Tyr Asp Gly Asp Ile Phe Leu Thr Ile Leu Leu Asn 165 170 175	528
gga ttc atc cac acg gtg atg tac acg tat tac ttc atc tgt atg cat Gly Phe Ile His Thr Val Met Tyr Thr Tyr Phe Ile Cys Met His 180 185 190	576
acc aaa gat tcc aag acg ggc aag agt ctt cct ata tgg tgg aag tcg Thr Lys Asp Ser Lys Thr Gly Lys Ser Leu Pro Ile Trp Trp Lys Ser 195 200 205	624
agt ttg acg gcg ttt cag ttg ttg caa ttc act atc atg atg agt cag Ser Leu Thr Ala Phe Gln Leu Leu Gln Phe Thr Ile Met Met Ser Gln 210 215 220	672
gct acc tac ctt gtc ttc cac ggg tgt gat aag gtg tcg ctt cgt atc Ala Thr Tyr Leu Val Phe His Gly Cys Asp Lys Val Ser Leu Arg Ile 225 230 235 240	720
acg att gtg tac ttt gtg tcc ctt ttg agt ttg ttc ttc ctt ttt gct Thr Ile Val Tyr Phe Val Ser Leu Leu Ser Leu Phe Phe Leu Phe Ala 245 250 255	768
cag ttc ttt gtg caa tca tac atg gca ccc aaa aag aag aag agt gct Gln Phe Phe Val Gln Ser Tyr Met Ala Pro Lys Lys Lys Lys Ser Ala 260 265 270	816
tag	819
<210> 46	
<211> 272	

&lt;212&gt; PRT

<213> *Thalassiosira pseudonana*

&lt;400&gt; 46

Met Asp Ala Tyr Asn Ala Ala Met Asp Lys Ile Gly Ala Ala Ile Ile  
 1 5 10 15

Asp Trp Ser Asp Pro Asp Gly Lys Phe Arg Ala Asp Arg Glu Asp Trp  
 20 25 30

Trp Leu Cys Asp Phe Arg Ser Ala Ile Thr Ile Ala Leu Ile Tyr Ile  
 35 40 45

Ala Phe Val Ile Leu Gly Ser Ala Val Met Gln Ser Leu Pro Ala Met  
 50 55 60

Asp Pro Tyr Pro Ile Lys Phe Leu Tyr Asn Val Ser Gln Ile Phe Leu  
 65 70 75 80

Cys Ala Tyr Met Thr Val Glu Ala Gly Phe Leu Ala Tyr Arg Asn Gly  
 85 90 95

Tyr Thr Val Met Pro Cys Asn His Phe Asn Val Asn Asp Pro Pro Val  
 100 105 110

Ala Asn Leu Leu Trp Leu Phe Tyr Ile Ser Lys Val Trp Asp Phe Trp  
 115 120 125

Asp Thr Ile Phe Ile Val Leu Gly Lys Lys Trp Arg Gln Leu Ser Phe  
 130 135 140

Leu His Val Tyr His His Thr Thr Ile Phe Leu Phe Tyr Trp Leu Asn  
 145 150 155 160

Ala Asn Val Leu Tyr Asp Gly Asp Ile Phe Leu Thr Ile Leu Leu Asn  
 165 170 175

Gly Phe Ile His Thr Val Met Tyr Thr Tyr Tyr Phe Ile Cys Met His  
 180 185 190

Thr Lys Asp Ser Lys Thr Gly Lys Ser Leu Pro Ile Trp Trp Lys Ser  
 195 200 205

Ser Leu Thr Ala Phe Gln Leu Leu Gln Phe Thr Ile Met Met Ser Gln  
 210 215 220

Ala Thr Tyr Leu Val Phe His Gly Cys Asp Lys Val Ser Leu Arg Ile  
 225 230 235 240



## 82

Thr Ile Val Tyr Phe Val Ser Leu Leu Ser Leu Phe Phe Leu Phe Ala  
 245 250 255

Gln Phe Phe Val Gln Ser Tyr Met Ala Pro Lys Lys Lys Lys Ser Ala  
 260 265 270

<210> 47

<211> 936

<212> DNA

<213> *Crypthecodinium cohnii*

<220>

<221> CDS

<222> (1) .. (936)

<223> Delta-5-Elongase

<400> 47  
 atg tct gcc ttc atg act ctc cca cag gct ctc tcc gat gtg acc tcg 48  
 Met Ser Ala Phe Met Thr Leu Pro Gln Ala Leu Ser Asp Val Thr Ser  
 1 5 10 15  
 gcc ttg gtc acg ctg gga aag gat gtc tcc agc cct tca gct ttt caa 96  
 Ala Leu Val Thr Leu Gly Lys Asp Val Ser Ser Pro Ser Ala Phe Gln  
 20 25 30  
 gct gtc act ggc ttc tgc agg gag cag tgg ggg att ccg aca gta ttc 144  
 Ala Val Thr Gly Phe Cys Arg Glu Gln Trp Gly Ile Pro Thr Val Phe  
 35 40 45  
 tgc ctg ggc tac ttg gcc atg gtc tac gcg gcc aga aga ccc ctc ccg 192  
 Cys Leu Gly Tyr Leu Ala Met Val Tyr Ala Ala Arg Arg Pro Leu Pro  
 50 55 60  
 cag cac ggc tac atg gtt gcg gtg gac cgt tgc ttc gct gct tgg aac 240  
 Gln His Gly Tyr Met Val Ala Val Asp Arg Cys Phe Ala Ala Trp Asn  
 65 70 75 80  
 ttg gct ctc tct gtc ttc agc act tgg ggc ttc tac cac atg gct gtc 288  
 Leu Ala Leu Ser Val Phe Ser Thr Trp Gly Phe Tyr His Met Ala Val  
 85 90 95  
 ggg ctc tac aac atg aca gag acg agg ggc ttg caa ttc acc atc tgc 336  
 Gly Leu Tyr Asn Met Thr Glu Thr Arg Gly Leu Gln Phe Thr Ile Cys  
 100 105 110  
 ggt tcg act ggg gag ctc gtg cag aac ctt cag act ggc cca acc gct 384  
 Gly Ser Thr Gly Glu Leu Val Gln Asn Leu Gln Thr Gly Pro Thr Ala  
 115 120 125  
 ctg gcg ctc tgc ctc ttc tgc ttc agc aag atc ccc gag ttg atg gac 432  
 Leu Ala Leu Cys Leu Phe Cys Phe Ser Lys Ile Pro Glu Leu Met Asp  
 130 135 140  
 acg gtg ttt ctc atc ctg aag gcc aag aag gtc cgc ttc ttg cag tgg 480  
 Thr Val Phe Leu Ile Leu Lys Ala Lys Lys Val Arg Phe Leu Gln Trp  
 145 150 155 160

tac cac cat gcc aca gtc atg ctc ttc tgt tgg ctc gcc ctc gcg acg 528  
 Tyr His His Ala Thr Val Met Leu Phe Cys Trp Leu Ala Leu Ala Thr  
 165 170 175  
 gag tac act cct ggc ttg tgg ttt gcg gcg acg aac tac ttc gtg cac 576  
 Glu Tyr Thr Pro Gly Leu Trp Phe Ala Ala Thr Asn Tyr Phe Val His  
 180 185 190  
 tcc atc atg tac atg tac ttc ttc ctc atg acc ttc aag tcg gcc gcg 624  
 Ser Ile Met Tyr Met Tyr Phe Phe Leu Met Thr Phe Lys Ser Ala Ala  
 195 200 205  
 aag gtg gtg aag ccc atc gcc cct ctc atc aca gtt atc cag att gct 672  
 Lys Val Val Lys Pro Ile Ala Pro Leu Ile Thr Val Ile Gln Ile Ala  
 210 215 220  
 cag atg gtc tgg ggc ctc atc gtc aac ggc atc gcc atc acc acc ttc 720  
 Gln Met Val Trp Gly Leu Ile Val Asn Gly Ile Ala Ile Thr Thr Phe  
 225 230 235 240  
 ttc acg act ggt gcc tgc cag atc cag tct gtg act gtg tat tcg gcc 768  
 Phe Thr Thr Gly Ala Cys Gln Ile Gln Ser Val Thr Val Tyr Ser Ala  
 245 250 255  
 atc atc atg tac gct tcg tac ttc tac ctg ttc tcc cag ctc ttc ttc 816  
 Ile Ile Met Tyr Ala Ser Tyr Phe Tyr Leu Phe Ser Gln Leu Phe Phe  
 260 265 270  
 gag gcc cat ggt gcc gct ggc aag aac aag aag aag ttg acc cgc gag 864  
 Glu Ala His Gly Ala Ala Gly Lys Asn Lys Lys Lys Leu Thr Arg Glu  
 275 280 285  
 ctc tct cga aaa atc tcg gag gct ctc ctg aac acc ggt gac gag gtt 912  
 Leu Ser Arg Lys Ile Ser Glu Ala Leu Leu Asn Thr Gly Asp Glu Val  
 290 295 300  
 tcc aag cac ctg aag gtg aat tga 936  
 Ser Lys His Leu Lys Val Asn  
 305 310

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 311

&lt;212&gt; PRT

<213> *Crypthecodinium cohnii*

&lt;400&gt; 48

Met Ser Ala Phe Met Thr Leu Pro Gln Ala Leu Ser Asp Val Thr Ser  
 1 5 10 15

Ala Leu Val Thr Leu Gly Lys Asp Val Ser Ser Pro Ser Ala Phe Gln  
 20 25 30

Ala Val Thr Gly Phe Cys Arg Glu Gln Trp Gly Ile Pro Thr Val Phe  
 35 40 45

Cys Leu Gly Tyr Leu Ala Met Val Tyr Ala Ala Arg Arg Pro Leu Pro  
 50 55 60

Gln His Gly Tyr Met Val Ala Val Asp Arg Cys Phe Ala Ala Trp Asn  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Leu Ser Val Phe Ser Thr Trp Gly Phe Tyr His Met Ala Val  
 85 90 95  
 Gly Leu Tyr Asn Met Thr Glu Thr Arg Gly Leu Gln Phe Thr Ile Cys  
 100 105 110  
 Gly Ser Thr Gly Glu Leu Val Gln Asn Leu Gln Thr Gly Pro Thr Ala  
 115 120 125  
 Leu Ala Leu Cys Leu Phe Cys Phe Ser Lys Ile Pro Glu Leu Met Asp  
 130 135 140  
 Thr Val Phe Leu Ile Leu Lys Ala Lys Lys Val Arg Phe Leu Gln Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr His His Ala Thr Val Met Leu Phe Cys Trp Leu Ala Leu Ala Thr  
 165 170 175  
 Glu Tyr Thr Pro Gly Leu Trp Phe Ala Ala Thr Asn Tyr Phe Val His  
 180 185 190  
 Ser Ile Met Tyr Met Tyr Phe Phe Leu Met Thr Phe Lys Ser Ala Ala  
 195 200 205  
 Lys Val Val Lys Pro Ile Ala Pro Leu Ile Thr Val Ile Gln Ile Ala  
 210 215 220  
 Gln Met Val Trp Gly Leu Ile Val Asn Gly Ile Ala Ile Thr Thr Phe  
 225 230 235 240  
 Phe Thr Thr Gly Ala Cys Gln Ile Gln Ser Val Thr Val Tyr Ser Ala  
 245 250 255  
 Ile Ile Met Tyr Ala Ser Tyr Phe Tyr Leu Phe Ser Gln Leu Phe Phe  
 260 265 270  
 Glu Ala His Gly Ala Ala Gly Lys Asn Lys Lys Lys Leu Thr Arg Glu  
 275 280 285  
 Leu Ser Arg Lys Ile Ser Glu Ala Leu Leu Asn Thr Gly Asp Glu Val  
 290 295 300  
 Ser Lys His Leu Lys Val Asn  
 305 310

&lt;211&gt; 927

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Crypthecodinium cohnii

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(927)

&lt;223&gt; Delta-5-Elongase

```

<400> 49
atg gct tcc tac caa caa gca ttc tcc gaa ttg gct aga gct ttg tcc 48
Met Ala Ser Tyr Gln Gln Ala Phe Ser Glu Leu Ala Arg Ala Leu Ser
1 5 10 15

act ttg aac cac gac ttc tcc agc gtc gag cca ttc aaa gtc gtg acg 96
Thr Leu Asn His Asp Phe Ser Ser Val Glu Pro Phe Lys Val Val Thr
20 25 30

cag ttc tgc agg gac cag tgg gcg atc ccg aca gtc ttt tgc atc ggt 144
Gln Phe Cys Arg Asp Gln Trp Ala Ile Pro Thr Val Phe Cys Ile Gly
35 40 45

tac ttg gca atg gtc tac gcc acg cga aga cct atc gcg aag cac ccc 192
Tyr Leu Ala Met Val Tyr Ala Thr Arg Arg Pro Ile Ala Lys His Pro
50 55 60

tac atg tct ctc gtg gat cgc tgc ttt gcg gcc tgg aac ttg ggc ctc 240
Tyr Met Ser Leu Val Asp Arg Cys Phe Ala Ala Trp Asn Leu Gly Leu
65 70 75 80

tcg ctc ttc agt tgc tgg ggc ttc tac cac atg gca gtg gga ctc tcc 288
Ser Leu Phe Ser Cys Trp Gly Phe Tyr His Met Ala Val Gly Leu Ser
85 90 95

cac acc act tgg aat ttc ggg ctc cag ttc acc atc tgc ggc agc acc 336
His Thr Thr Trp Asn Phe Gly Leu Gln Phe Thr Ile Cys Gly Ser Thr
100 105 110

acg gag ctt gtg aat ggc ttc cag aag ggc ccg gcg gcc ctc gcc ctc 384
Thr Glu Leu Val Asn Gly Phe Gln Lys Gly Pro Ala Ala Leu Ala Leu
115 120 125

atc ctg ttc tgc ttc tcc aag atc ccg gag ttg ggc gac acc gtc ttc 432
Ile Leu Phe Cys Phe Ser Lys Ile Pro Glu Leu Gly Asp Thr Val Phe
130 135 140

ttg atc ttg aag gga aag aag gtc cgc ttc ttg cag tgg tac cac cac 480
Leu Ile Leu Lys Gly Lys Lys Val Arg Phe Leu Gln Trp Tyr His His
145 150 155 160

acg acc gtg atg ctc ttc tgt tgg atg gcc ttg gcg act gag tac act 528
Thr Thr Val Met Leu Phe Cys Trp Met Ala Leu Ala Thr Glu Tyr Thr
165 170 175

cct gga ttg tgg ttc gcg gcc acg aac tac ttc gtg cac tcc atc atg 576
Pro Gly Leu Trp Phe Ala Ala Thr Asn Tyr Phe Val His Ser Ile Met
180 185 190

tac atg tac ttc ttc ctc atg acc ttc aag acg gcc gcc ggc atc atc 624

```

## 86

Tyr Met Tyr Phe Phe Leu Met Thr Phe Lys Thr Ala Ala Gly Ile Ile  
 195 200 205  
 aag ccc atc gcg cct ctc atc acc atc atc cag atc tcc cag atg gtc 672  
 Lys Pro Ile Ala Pro Leu Ile Thr Ile Ile Gln Ile Ser Gln Met Val  
 210 215 220  
 tgg ggc ttg gtc gtg aac gcc atc gcc gtc ggc acc ttc ttc acc aca 720  
 Trp Gly Leu Val Val Asn Ala Ile Ala Val Gly Thr Phe Phe Thr Thr  
 225 230 235 240  
 ggc aac tgc cag atc cag gca gtg aca gtc tac tcc gcc atc gtg atg 768  
 Gly Asn Cys Gln Ile Gln Ala Val Thr Val Tyr Ser Ala Ile Val Met  
 245 250 255  
 tac gcc tcc tac ttc tac ctc ttc ggc cag ctc ttc ttc gag gcc cag 816  
 Tyr Ala Ser Tyr Phe Tyr Leu Phe Gly Gln Leu Phe Phe Glu Ala Gln  
 260 265 270  
 ggt tgc gct gga aag gac aag aag aag ttg gcc cga gag ctg agc cga 864  
 Gly Ser Ala Gly Lys Asp Lys Lys Lys Leu Ala Arg Glu Leu Ser Arg  
 275 280 285  
 aag gtc tgc cgg gct ctc aca gca acg ggc gaa gag gtg tgc aag cac 912  
 Lys Val Ser Arg Ala Leu Thr Ala Thr Gly Glu Glu Val Ser Lys His  
 290 295 300  
 atg aag gtg aat tga 927  
 Met Lys Val Asn  
 305

&lt;210&gt; 50

&lt;211&gt; 308

&lt;212&gt; PRT

<213> *Crypthecodinium cohnii*

&lt;400&gt; 50

Met Ala Ser Tyr Gln Gln Ala Phe Ser Glu Leu Ala Arg Ala Leu Ser  
 1 5 10 15

Thr Leu Asn His Asp Phe Ser Ser Val Glu Pro Phe Lys Val Val Thr  
 20 25 30

Gln Phe Cys Arg Asp Gln Trp Ala Ile Pro Thr Val Phe Cys Ile Gly  
 35 40 45

Tyr Leu Ala Met Val Tyr Ala Thr Arg Arg Pro Ile Ala Lys His Pro  
 50 55 60

Tyr Met Ser Leu Val Asp Arg Cys Phe Ala Ala Trp Asn Leu Gly Leu  
 65 70 75 80

Ser Leu Phe Ser Cys Trp Gly Phe Tyr His Met Ala Val Gly Leu Ser  
 85 90 95

## 87

His Thr Thr Trp Asn Phe Gly Leu Gln Phe Thr Ile Cys Gly Ser Thr  
 100 105 110

Thr Glu Leu Val Asn Gly Phe Gln Lys Gly Pro Ala Ala Leu Ala Leu  
 115 120 125

Ile Leu Phe Cys Phe Ser Lys Ile Pro Glu Leu Gly Asp Thr Val Phe  
 130 135 140

Leu Ile Leu Lys Gly Lys Lys Val Arg Phe Leu Gln Trp Tyr His His  
 145 150 155 160

Thr Thr Val Met Leu Phe Cys Trp Met Ala Leu Ala Thr Glu Tyr Thr  
 165 170 175

Pro Gly Leu Trp Phe Ala Ala Thr Asn Tyr Phe Val His Ser Ile Met  
 180 185 190

Tyr Met Tyr Phe Phe Leu Met Thr Phe Lys Thr Ala Ala Gly Ile Ile  
 195 200 205

Lys Pro Ile Ala Pro Leu Ile Thr Ile Ile Gln Ile Ser Gln Met Val  
 210 215 220

Trp Gly Leu Val Val Asn Ala Ile Ala Val Gly Thr Phe Phe Thr Thr  
 225 230 235 240

Gly Asn Cys Gln Ile Gln Ala Val Thr Val Tyr Ser Ala Ile Val Met  
 245 250 255

Tyr Ala Ser Tyr Phe Tyr Leu Phe Gly Gln Leu Phe Phe Glu Ala Gln  
 260 265 270

Gly Ser Ala Gly Lys Asp Lys Lys Lys Leu Ala Arg Glu Leu Ser Arg  
 275 280 285

Lys Val Ser Arg Ala Leu Thr Ala Thr Gly Glu Glu Val Ser Lys His  
 290 295 300

Met Lys Val Asn  
 305

<210> 51

<211> 795

<212> DNA

<213> Oncorhynchus mykiss

<220>

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(795)

&lt;223&gt; Delta-5-Elongase

&lt;400&gt; 51

atg gct tca aca tgg caa agc gtt cag tcc atg cgc cag tgg att tta	48
Met Ala Ser Thr Trp Gln Ser Val Gln Ser Met Arg Gln Trp Ile Leu	
1 5 10 15	
gag aat gga gat aaa agg aca gac cca tgg cta ctg gtc tac tcc cct	96
Glu Asn Gly Asp Lys Arg Thr Asp Pro Trp Leu Leu Val Tyr Ser Pro	
20 25 30	
atg cca gtg gcc att ata ttc ctc ctc tat ctt ggt gtg gtc tgg gct	144
Met Pro Val Ala Ile Ile Phe Leu Leu Tyr Leu Gly Val Val Trp Ala	
35 40 45	
ggg ccc aag ctg atg aaa cgc agg gaa cca gtt gat ctc aag gct gta	192
Gly Pro Lys Leu Met Lys Arg Arg Glu Pro Val Asp Leu Lys Ala Val	
50 55 60	
ctc att gtc tac aac ttc gcc atg gtc tgc ctg tct gtc tac atg ttc	240
Leu Ile Val Tyr Asn Phe Ala Met Val Cys Leu Ser Val Tyr Met Phe	
65 70 75 80	
cat gag ttc ttg gtc acg tcc ttg ctg tct aac tac agt tac ctg tgt	288
His Glu Phe Leu Val Thr Ser Leu Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Leu Cys	
85 90 95	
caa cct gtg gat tac agc act agt cca ctg gcg atg agg atg gcc aaa	336
Gln Pro Val Asp Tyr Ser Thr Ser Pro Leu Ala Met Arg Met Ala Lys	
100 105 110	
gta tgc tgg tgg ttt ttc ttc tcc aag gtc ata gaa ttg gct gac acg	384
Val Cys Trp Trp Phe Phe Phe Ser Lys Val Ile Glu Leu Ala Asp Thr	
115 120 125	
gtg ttc ttc atc ctg agg aag aag aac agt cag ctg act ttc ctg cat	432
Val Phe Phe Ile Leu Arg Lys Lys Asn Ser Gln Leu Thr Phe Leu His	
130 135 140	
gtc tat cac cat ggc acc atg atc ttc aac tgg tgg gca ggg gtc aag	480
Val Tyr His His Gly Thr Met Ile Phe Asn Trp Trp Ala Gly Val Lys	
145 150 155 160	
tat ctg gct gga ggc caa tcg ttc ttc atc ggc ctg ctc aat acc ttt	528
Tyr Leu Ala Gly Gly Gln Ser Phe Phe Ile Gly Leu Leu Asn Thr Phe	
165 170 175	
gtg cac atc gtg atg tac tct tac tac gga ctg gct gcc ctg ggg cct	576
Val His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Gly Leu Ala Ala Leu Gly Pro	
180 185 190	
cac acg cag aag tac tta tgg tgg aag cgc tat ctg acc tca ctg cag	624
His Thr Gln Lys Tyr Leu Trp Trp Lys Arg Tyr Leu Thr Ser Leu Gln	
195 200 205	
ctg ctc cag ttt gtc ctg ttg acc act cac act ggc tac aac ctc ttc	672
Leu Leu Gln Phe Val Leu Leu Thr Thr His Thr Gly Tyr Asn Leu Phe	
210 215 220	
act gag tgt gac ttc ccg gac tcc atg aac gct gtg gtg ttt gcc tac	720
Thr Glu Cys Asp Phe Pro Asp Ser Met Asn Ala Val Val Phe Ala Tyr	
225 230 235 240	

tgt gtc agt ctc att gct ctc ttc agc aac ttc tac tat cag agc tac 768  
 Cys Val Ser Leu Ile Ala Leu Phe Ser Asn Phe Tyr Tyr Gln Ser Tyr  
                   245                                   250                                   255

ctc aac agg aag agc aag aag aca taa 795  
 Leu Asn Arg Lys Ser Lys Lys Thr  
                   260

<210> 52

<211> 264

<212> PRT

<213> Oncorhynchus mykiss

<400> 52

Met Ala Ser Thr Trp Gln Ser Val Gln Ser Met Arg Gln Trp Ile Leu  
 1                                   5                                   10                                   15

Glu Asn Gly Asp Lys Arg Thr Asp Pro Trp Leu Leu Val Tyr Ser Pro  
                   20                                   25                                   30

Met Pro Val Ala Ile Ile Phe Leu Leu Tyr Leu Gly Val Val Trp Ala  
                   35                                   40                                   45

Gly Pro Lys Leu Met Lys Arg Arg Glu Pro Val Asp Leu Lys Ala Val  
                   50                                   55                                   60

Leu Ile Val Tyr Asn Phe Ala Met Val Cys Leu Ser Val Tyr Met Phe  
 65                                   70                                   75                                   80

His Glu Phe Leu Val Thr Ser Leu Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Leu Cys  
                   85                                   90                                   95

Gln Pro Val Asp Tyr Ser Thr Ser Pro Leu Ala Met Arg Met Ala Lys  
                   100                                   105                                   110

Val Cys Trp Trp Phe Phe Phe Ser Lys Val Ile Glu Leu Ala Asp Thr  
                   115                                   120                                   125

Val Phe Phe Ile Leu Arg Lys Lys Asn Ser Gln Leu Thr Phe Leu His  
                   130                                   135                                   140

Val Tyr His His Gly Thr Met Ile Phe Asn Trp Trp Ala Gly Val Lys  
 145                                   150                                   155                                   160

Tyr Leu Ala Gly Gly Gln Ser Phe Phe Ile Gly Leu Leu Asn Thr Phe  
                   165                                   170                                   175

Val His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Gly Leu Ala Ala Leu Gly Pro  
                   180                                   185                                   190



His Thr Gln Lys Tyr Leu Trp Trp Lys Arg Tyr Leu Thr Ser Leu Gln  
 195 200 205

Leu Leu Gln Phe Val Leu Leu Thr Thr His Thr Gly Tyr Asn Leu Phe  
 210 215 220

Thr Glu Cys Asp Phe Pro Asp Ser Met Asn Ala Val Val Phe Ala Tyr  
 225 230 235 240

Cys Val Ser Leu Ile Ala Leu Phe Ser Asn Phe Tyr Tyr Gln Ser Tyr  
 245 250 255

Leu Asn Arg Lys Ser Lys Lys Thr  
 260

<210> 53

<211> 885

<212> DNA

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(885)

<223> Delta-5-Elongase

<400> 53

atg gag act ttt aat tat aaa cta aac atg tac ata gac tca tgg atg 48  
 Met Glu Thr Phe Asn Tyr Lys Leu Asn Met Tyr Ile Asp Ser Trp Met  
 1 5 10 15

ggc ccc aga gat gag cgg gta cag gga tgg ctg ctt ctg gac aac tac 96  
 Gly Pro Arg Asp Glu Arg Val Gln Gly Trp Leu Leu Leu Asp Asn Tyr  
 20 25 30

cct cca acc ttt gca cta aca gtc atg tac ctg ctg atc gta tgg atg 144  
 Pro Pro Thr Phe Ala Leu Thr Val Met Tyr Leu Leu Ile Val Trp Met  
 35 40 45

ggg ccc aag tac atg aga cac aga cag ccg gtg tct tgc cgg ggt ctc 192  
 Gly Pro Lys Tyr Met Arg His Arg Gln Pro Val Ser Cys Arg Gly Leu  
 50 55 60

ctc ttg gtc tac aat ctg ggc ctc acg atc ttg tcc ttc tat atg ttc 240  
 Leu Leu Val Tyr Asn Leu Gly Leu Thr Ile Ser Phe Tyr Met Phe  
 65 70 75 80

tat gag atg gtg tct gct gtg tgg cac ggg gat tat aac ttc ttt tgc 288  
 Tyr Glu Met Val Ser Ala Val Trp His Gly Asp Tyr Asn Phe Phe Cys  
 85 90 95

caa gac aca cac agt gca gga gaa acc gat acc aag atc ata aat gtg 336

## 91

Gln	Asp	Thr	His	Ser	Ala	Gly	Glu	Thr	Asp	Thr	Lys	Ile	Ile	Asn	Val		
			100					105					110				
ctg	tgg	tgg	tac	tac	ttc	tcc	aag	ctc	ata	gag	ttt	atg	gat	acc	ttc	384	
Leu	Trp	Trp	Tyr	Tyr	Phe	Ser	Lys	Leu	Ile	Glu	Phe	Met	Asp	Thr	Phe		
		115					120					125					
ttc	ttc	atc	ctg	cgg	aag	aac	aac	cat	caa	atc	acg	ttt	ctg	cac	atc	432	
Phe	Phe	Ile	Leu	Arg	Lys	Asn	Asn	His	Gln	Ile	Thr	Phe	Leu	His	Ile		
		130				135					140						
tac	cac	cat	gct	agc	atg	ctc	aac	atc	tgg	tgg	ttc	gtc	atg	aac	tgg	480	
Tyr	His	His	Ala	Ser	Met	Leu	Asn	Ile	Trp	Trp	Phe	Val	Met	Asn	Trp		
145					150					155					160		
gtg	ccc	tgt	ggt	cac	tcc	tac	ttt	ggt	gcc	tcc	ctg	aac	agc	ttc	atc	528	
Val	Pro	Cys	Gly	His	Ser	Tyr	Phe	Gly	Ala	Ser	Leu	Asn	Ser	Phe	Ile		
			165					170						175			
cat	gtc	ctg	atg	tac	tct	tac	tat	ggg	ctc	tct	gct	gtc	ccg	gcc	ttg	576	
His	Val	Leu	Met	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Leu	Ser	Ala	Val	Pro	Ala	Leu		
			180					185					190				
cgg	ccc	tat	cta	tgg	tgg	aag	aaa	tac	atc	aca	caa	gta	cag	ctg	att	624	
Arg	Pro	Tyr	Leu	Trp	Trp	Lys	Lys	Tyr	Ile	Thr	Gln	Val	Gln	Leu	Ile		
		195				200						205					
cag	ttc	ttt	ttg	acc	atg	tcc	cag	acg	ata	tgt	gca	gtc	att	tgg	cca	672	
Gln	Phe	Phe	Leu	Thr	Met	Ser	Gln	Thr	Ile	Cys	Ala	Val	Ile	Trp	Pro		
	210					215					220						
tgt	gat	ttc	ccc	aga	ggg	tgg	ctg	tat	ttc	cag	ata	ttc	tat	gtc	atc	720	
Cys	Asp	Phe	Pro	Arg	Gly	Trp	Leu	Tyr	Phe	Gln	Ile	Phe	Tyr	Val	Ile		
225					230					235					240		
aca	ctt	att	gcc	ctt	ttc	tca	aac	ttc	tac	att	cag	act	tac	aag	aaa	768	
Thr	Leu	Ile	Ala	Leu	Phe	Ser	Asn	Phe	Tyr	Ile	Gln	Thr	Tyr	Lys	Lys		
			245					250						255			
cac	ctt	gtt	tca	caa	aag	aag	gag	tat	cat	cag	aat	ggc	tct	gtt	gct	816	
His	Leu	Val	Ser	Gln	Lys	Lys	Glu	Tyr	His	Gln	Asn	Gly	Ser	Val	Ala		
			260					265						270			
tca	ttg	aat	ggc	cat	gtg	aat	ggg	gtg	aca	ccc	acg	gaa	acc	att	aca	864	
Ser	Leu	Asn	Gly	His	Val	Asn	Gly	Val	Thr	Pro	Thr	Glu	Thr	Ile	Thr		
		275					280					285					
cac	agg	aaa	gtg	agg	ggg	gac										885	
His	Arg	Lys	Val	Arg	Gly	Asp											
		290				295											

&lt;210&gt; 54

&lt;211&gt; 295

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Oncorhynchus mykiss

&lt;400&gt; 54

Met	Glu	Thr	Phe	Asn	Tyr	Lys	Leu	Asn	Met	Tyr	Ile	Asp	Ser	Trp	Met
1				5					10					15	

## 92

Gly Pro Arg Asp Glu Arg Val Gln Gly Trp Leu Leu Leu Asp Asn Tyr  
 20 25 30

Pro Pro Thr Phe Ala Leu Thr Val Met Tyr Leu Leu Ile Val Trp Met  
 35 40 45

Gly Pro Lys Tyr Met Arg His Arg Gln Pro Val Ser Cys Arg Gly Leu  
 50 55 60

Leu Leu Val Tyr Asn Leu Gly Leu Thr Ile Leu Ser Phe Tyr Met Phe  
 65 70 75 80

Tyr Glu Met Val Ser Ala Val Trp His Gly Asp Tyr Asn Phe Phe Cys  
 85 90 95

Gln Asp Thr His Ser Ala Gly Glu Thr Asp Thr Lys Ile Ile Asn Val  
 100 105 110

Leu Trp Trp Tyr Tyr Phe Ser Lys Leu Ile Glu Phe Met Asp Thr Phe  
 115 120 125

Phe Phe Ile Leu Arg Lys Asn Asn His Gln Ile Thr Phe Leu His Ile  
 130 135 140

Tyr His His Ala Ser Met Leu Asn Ile Trp Trp Phe Val Met Asn Trp  
 145 150 155 160

Val Pro Cys Gly His Ser Tyr Phe Gly Ala Ser Leu Asn Ser Phe Ile  
 165 170 175

His Val Leu Met Tyr Ser Tyr Tyr Gly Leu Ser Ala Val Pro Ala Leu  
 180 185 190

Arg Pro Tyr Leu Trp Trp Lys Lys Tyr Ile Thr Gln Val Gln Leu Ile  
 195 200 205

Gln Phe Phe Leu Thr Met Ser Gln Thr Ile Cys Ala Val Ile Trp Pro  
 210 215 220

Cys Asp Phe Pro Arg Gly Trp Leu Tyr Phe Gln Ile Phe Tyr Val Ile  
 225 230 235 240

Thr Leu Ile Ala Leu Phe Ser Asn Phe Tyr Ile Gln Thr Tyr Lys Lys  
 245 250 255

His Leu Val Ser Gln Lys Lys Glu Tyr His Gln Asn Gly Ser Val Ala  
 260 265 270

Ser Leu Asn Gly His Val Asn Gly Val Thr Pro Thr Glu Thr Ile Thr  
 275 280 285

His Arg Lys Val Arg Gly Asp  
290 295

<210> 55

<211> 6753

<212> DNA

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<220>

<221> CDS

<222> (513)..(1397)

<223> Delta-5-Elongase

<400> 55

```

acggattaga agccgccgag cgggtgacag cctccgaag gaagactctc ctccgtgcgt      60
cctcgtcctc accggtcgcg ttcctgaaac gcagatgtgc ctgcgccgc actgctccga      120
acaataaaga ttctacaata ctagctttta tggttatgaa gaggaaaaat tggcagtaac      180
ctggccccac aaaccttcaa atgaacgaat caaattaaca accataggat gataatgcga      240
ttagtttttt agccttattt ctggggtaat taatcagcga agcgatgatt tttgatctat      300
taacagatat ataaatgcaa aaactgcatt aaccacttta actaatactt tcaacatttt      360
cggtttgtat tacttcttat tcaaatgtaa taaaagtatc aacaaaaaat tgттаатата      420
cctctatact ttaacgtcaa ggagaaaaaa ccccggtatcg gactactagc agctgtaata      480
cgactcacta tagggaatat taagcttaca ta atg gag act ttt aat tat aaa      533
                               Met Glu Thr Phe Asn Tyr Lys
                               1           5

cta aac atg tac ata gac tca tgg atg ggt ccc aga gat gag cgg gta      581
Leu Asn Met Tyr Ile Asp Ser Trp Met Gly Pro Arg Asp Glu Arg Val
      10           15           20

cag gga tgg ctg ctt ctg gac aac tac cct cca acc ttt gca cta aca      629
Gln Gly Trp Leu Leu Leu Asp Asn Tyr Pro Pro Thr Phe Ala Leu Thr
      25           30           35

gtc atg tac ctg ctg atc gta tgg atg ggg ccc aag tac atg aga cac      677
Val Met Tyr Leu Leu Ile Val Trp Met Gly Pro Lys Tyr Met Arg His
      40           45           50           55

aga cag ccg gtg tct tgc cgg ggt ctc ctc ttg gtc tac aat ctg ggc      725
Arg Gln Pro Val Ser Cys Arg Gly Leu Leu Leu Val Tyr Asn Leu Gly
      60           65           70

ctc acg atc ttg tcc ttc tat atg ttc tat gag atg gtg tct gct gtg      773
Leu Thr Ile Leu Ser Phe Tyr Met Phe Tyr Glu Met Val Ser Ala Val
      75           80           85

tgg cac ggg gat tat aac ttc ttt tgc caa gac aca cac agt gca gga      821
Trp His Gly Asp Tyr Asn Phe Phe Cys Gln Asp Thr His Ser Ala Gly
      90           95           100

```

199

Tyr Val Lys Cys Pro Ser Pro Val Trp Met His Trp Ala Leu Ile Leu  
 225 230 235 240  
 tac gct ttc tca ttc att ttg ctt ttc tca aac ttc tac atg cat gcc 768  
 Tyr Ala Phe Ser Phe Ile Leu Leu Phe Ser Asn Phe Tyr Met His Ala  
 245 250 255  
 tat atc aag aaa tca aga aaa ggg aaa gag aat ggc agt cga gga aaa 816  
 Tyr Ile Lys Lys Ser Arg Lys Gly Lys Glu Asn Gly Ser Arg Gly Lys  
 260 265 270  
 ggt ggt gta agt aat gga aag gaa aag ctg cac gct aat ggt aaa acc 864  
 Gly Gly Val Ser Asn Gly Lys Glu Lys Leu His Ala Asn Gly Lys Thr  
 275 280 285  
 gat taa 870  
 Asp

&lt;210&gt; 120

&lt;211&gt; 289

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Ciona intestinalis

&lt;400&gt; 120

Met Asp Val Leu His Arg Phe Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr Leu Thr  
 1 5 10 15

Phe Ala Asp Pro Arg Val Ala Lys Trp Pro Leu Ile Glu Asn Pro Leu  
 20 25 30

Pro Thr Ile Ala Ile Val Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Val Leu Tyr Ile  
 35 40 45

Gly Pro Arg Phe Met Arg Lys Arg Ala Pro Val Asp Phe Gly Leu Phe  
 50 55 60

Leu Pro Gly Tyr Asn Phe Ala Leu Val Ala Leu Asn Tyr Tyr Ile Leu  
 65 70 75 80

Gln Glu Val Val Thr Gly Ser Tyr Gly Ala Gly Tyr Asp Leu Val Cys  
 85 90 95

Thr Pro Leu Arg Ser Asp Ser Tyr Asp Pro Asn Glu Met Lys Val Ala  
 100 105 110

Asn Ala Val Trp Trp Tyr Tyr Val Ser Lys Ile Ile Glu Leu Phe Asp  
 115 120 125

Thr Val Leu Phe Thr Leu Arg Lys Arg Asp Arg Gln Val Thr Phe Leu  
 130 135 140

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(870)

&lt;223&gt; Delta-5-Elongase

```

<400> 119
atg gac gta ctt cat cgt ttc tta gga ttc tac gaa tgg acg ctg act      48
Met Asp Val Leu His Arg Phe Leu Gly Phe Tyr Glu Trp Thr Leu Thr
1          5          10          15

ttc gcg gac ccc cga gtg gca aaa tgg cct tta ata gaa aac ccc ctt      96
Phe Ala Asp Pro Arg Val Ala Lys Trp Pro Leu Ile Glu Asn Pro Leu
20          25          30

cct aca att gct att gtg ttg ctg tac ctg gcg ttt gtt ctg tat att      144
Pro Thr Ile Ala Ile Val Leu Leu Tyr Leu Ala Phe Val Leu Tyr Ile
35          40          45

ggg ccg cgt ttt atg cga aaa aga gca cca gtt gac ttt ggt tta ttc      192
Gly Pro Arg Phe Met Arg Lys Arg Ala Pro Val Asp Phe Gly Leu Phe
50          55          60

ctc cct gga tat aac ttt gct ttg gtt gca tta aat tat tat atc ctg      240
Leu Pro Gly Tyr Asn Phe Ala Leu Val Ala Leu Asn Tyr Tyr Ile Leu
65          70          75          80

caa gaa gtg gtc act ggg agt tat ggg gct ggg tat gat ttg gtt tgc      288
Gln Glu Val Val Thr Gly Ser Tyr Gly Ala Gly Tyr Asp Leu Val Cys
85          90          95

aca cca ctt cga agt gat tcc tac gat ccc aat gaa atg aag gtt gca      336
Thr Pro Leu Arg Ser Asp Ser Tyr Asp Pro Asn Glu Met Lys Val Ala
100          105          110

aac gct gta tgg tgg tat tat gta tcc aag ata ata gag ttg ttt gat      384
Asn Ala Val Trp Trp Tyr Tyr Val Ser Lys Ile Ile Glu Leu Phe Asp
115          120          125

act gtg ttg ttc act cta cgc aaa cga gac cga caa gta act ttc ctt      432
Thr Val Leu Phe Thr Leu Arg Lys Arg Asp Arg Gln Val Thr Phe Leu
130          135          140

cat gtt tat cac cat tct acc atg ccc ctg ttg tgg tgg att ggg gca      480
His Val Tyr His His Ser Thr Met Pro Leu Leu Trp Trp Ile Gly Ala
145          150          155          160

aag tgg gtg cct ggt ggg caa tca ttt gtt ggc atc ata ctg aac tcc      528
Lys Trp Val Pro Gly Gly Gln Ser Phe Val Gly Ile Ile Leu Asn Ser
165          170          175

agt gtt cat gtt atc atg tat acg tac tat gga ttg tca gcc ttg ggg      576
Ser Val His Val Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr Gly Leu Ser Ala Leu Gly
180          185          190

cct cac atg cag aag ttt cta tgg tgg aag aaa tat atc aca atg ttg      624
Pro His Met Gln Lys Phe Leu Trp Trp Lys Lys Tyr Ile Thr Met Leu
195          200          205

caa ctg gtt caa ttt gtt ctt gcc atc tac cat act gct cga tca ttg      672
Gln Leu Val Gln Phe Val Leu Ala Ile Tyr His Thr Ala Arg Ser Leu
210          215          220

tac gtt aaa tgt ccc tcg cct gtt tgg atg cac tgg gca ctt atc ttg      720

```

Tyr Met Cys Tyr Glu Phe Leu Met Ser Gly Trp Ala Thr Gly Tyr Ser  
 85 90 95

Phe Arg Cys Asp Ile Val Asp Tyr Ser Gln Ser Pro Gln Ala Leu Arg  
 100 105 110

Met Ala Trp Thr Cys Trp Leu Phe Tyr Phe Ser Lys Phe Ile Glu Leu  
 115 120 125

Leu Asp Thr Val Phe Phe Val Leu Arg Lys Lys Asn Ser Gln Ile Thr  
 130 135 140

Phe Leu His Val Tyr His His Ser Ile Met Pro Trp Thr Trp Trp Phe  
 145 150 155 160

Gly Val Lys Phe Ala Pro Gly Gly Leu Gly Thr Phe His Ala Leu Val  
 165 170 175

Asn Cys Val Val His Val Ile Met Tyr Ser Tyr Tyr Gly Leu Ser Ala  
 180 185 190

Leu Gly Pro Ala Tyr Gln Lys Tyr Leu Trp Trp Lys Lys Tyr Met Thr  
 195 200 205

Ser Ile Gln Leu Thr Gln Phe Leu Met Val Thr Phe His Ile Gly Gln  
 210 215 220

Phe Phe Phe Met Glu Asn Cys Pro Tyr Gln Tyr Pro Val Phe Leu Tyr  
 225 230 235 240

Val Ile Trp Leu Tyr Gly Phe Val Phe Leu Ile Leu Phe Leu Asn Phe  
 245 250 255

Trp Phe His Ala Tyr Ile Lys Gly Gln Arg Leu Pro Lys Ala Val Gln  
 260 265 270

Asn Gly His Cys Lys Asn Asn Asn Asn Gln Glu Asn Thr Trp Cys Lys  
 275 280 285

Asn Lys Asn Gln Lys Asn Gly Ala Leu Lys Ser Lys Asn His  
 290 295 300

<210> 119  
 <211> 870  
 <212> DNA  
 <213> Ciona intestinalis

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## 196

gga gtc aaa ttt gct cca ggt ggt ttg ggc aca ttc cat gca ctg gtg 528  
 Gly Val Lys Phe Ala Pro Gly Gly Leu Gly Thr Phe His Ala Leu Val  
 165 170 175

aac tgt gtg gtc cat gtt atc atg tac agc tac tac ggc ctg tca gcc 576  
 Asn Cys Val Val His Val Ile Met Tyr Ser Tyr Tyr Gly Leu Ser Ala  
 180 185 190

ttg ggg cct gcc tac cag aag tac ctg tgg tgg aaa aag tac atg acg 624  
 Leu Gly Pro Ala Tyr Gln Lys Tyr Leu Trp Trp Lys Lys Tyr Met Thr  
 195 200 205

tct atc caa ctg acc cag ttc ttg atg gtt act ttt cac atc ggc cag 672  
 Ser Ile Gln Leu Thr Gln Phe Leu Met Val Thr Phe His Ile Gly Gln  
 210 215 220

ttc ttc ttc atg gag aat tgc ccg tac cag tat ccc gtc ttc ttg tat 720  
 Phe Phe Phe Met Glu Asn Cys Pro Tyr Gln Tyr Pro Val Phe Leu Tyr  
 225 230 235 240

gtc att tgg ctg tac ggg ttc gtt ttc tta atc ttg ttc ctc aac ttc 768  
 Val Ile Trp Leu Tyr Gly Phe Val Phe Leu Ile Leu Phe Leu Asn Phe  
 245 250 255

tgg ttc cac gct tac atc aaa gga cag agg ctg ccg aaa gcc gtc caa 816  
 Trp Phe His Ala Tyr Ile Lys Gly Gln Arg Leu Pro Lys Ala Val Gln  
 260 265 270

aat ggc cac tgc aag aac aac aac aac caa gaa aac act tgg tgc aag 864  
 Asn Gly His Cys Lys Asn Asn Asn Asn Gln Glu Asn Thr Trp Cys Lys  
 275 280 285

aac aaa aac cag aaa aac ggt gca ttg aaa agc aaa aac cat tga 909  
 Asn Lys Asn Gln Lys Asn Gly Ala Leu Lys Ser Lys Asn His  
 290 295 300

&lt;210&gt; 118

&lt;211&gt; 302

&lt;212&gt; PRT

<213> *Xenopus laevis*

&lt;400&gt; 118

Met Ala Phe Lys Glu Leu Thr Ser Arg Ala Val Leu Leu Tyr Asp Glu  
1 5 10 15

Trp Ile Lys Asp Ala Asp Pro Arg Val Glu Asp Trp Pro Leu Met Ser  
20 25 30

Ser Pro Ile Leu Gln Thr Ile Ile Ile Gly Ala Tyr Ile Tyr Phe Val  
35 40 45

Thr Ser Leu Gly Pro Arg Ile Met Glu Asn Arg Lys Pro Phe Ala Leu  
50 55 60

Lys Glu Ile Met Ala Cys Tyr Asn Leu Phe Met Val Leu Phe Ser Val  
65 70 75 80

&lt;400&gt; 116

His His Xaa Xaa Xaa Xaa Trp Ala Trp Trp  
 1 5 10

&lt;210&gt; 117

&lt;211&gt; 909

&lt;212&gt; DNA

<213> *Xenopus laevis*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(909)

&lt;223&gt; Delta-5-Elongase

&lt;400&gt; 117

atg gcc ttc aag gag ctc aca tca agg gca gtg ctc ctg tat gat gaa	48
Met Ala Phe Lys Glu Leu Thr Ser Arg Ala Val Leu Leu Tyr Asp Glu	
1 5 10 15	
tgg att aaa gat gct gat cct agg gtt gaa gac tgg cca ctc atg tcc	96
Trp Ile Lys Asp Ala Asp Pro Arg Val Glu Asp Trp Pro Leu Met Ser	
20 25 30	
tct cct atc cta caa acc atc atc atc ggc gct tac atc tac ttt gtc	144
Ser Pro Ile Leu Gln Thr Ile Ile Ile Gly Ala Tyr Ile Tyr Phe Val	
35 40 45	
aca tca ttg ggc cca agg atc atg gag aac agg aag ccg ttt gct ctg	192
Thr Ser Leu Gly Pro Arg Ile Met Glu Asn Arg Lys Pro Phe Ala Leu	
50 55 60	
aag gag atc atg gca tgt tac aac tta ttc atg gtt ctg ttt tct gtg	240
Lys Glu Ile Met Ala Cys Tyr Asn Leu Phe Met Val Leu Phe Ser Val	
65 70 75 80	
tac atg tgc tat gag ttt ctc atg tgc ggc tgg gct act gga tat tcc	288
Tyr Met Cys Tyr Glu Phe Leu Met Ser Gly Trp Ala Thr Gly Tyr Ser	
85 90 95	
ttt aga tgt gac att gtt gac tac tct cag tca cct cag gcg tta cgg	336
Phe Arg Cys Asp Ile Val Asp Tyr Ser Gln Ser Pro Gln Ala Leu Arg	
100 105 110	
atg gcc tgg acc tgc tgg ctc ttc tat ttt tca aag ttc att gaa tta	384
Met Ala Trp Thr Cys Trp Leu Phe Tyr Phe Ser Lys Phe Ile Glu Leu	
115 120 125	
tta gac act gtt ttc ttt gtg ctg cgt aag aag aac agc cag att aca	432
Leu Asp Thr Val Phe Phe Val Leu Arg Lys Lys Asn Ser Gln Ile Thr	
130 135 140	
ttc ctg cac gtc tat cac cac tcc att atg cct tgg acg tgg tgg ttt	480
Phe Leu His Val Tyr His His Ser Ile Met Pro Trp Thr Trp Trp Phe	
145 150 155 160	

Phe Val Ile Val Phe Ala His Ala Val Phe Val Leu Arg Gln Lys His  
 225 230 235 240

Cys Pro Val Thr Leu Pro Trp Ala Gln Met Phe Val Met Thr Asn Met  
 245 250 255

Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Leu Lys Ala Tyr Ser Asn Lys Ser  
 260 265 270

Arg Gly Asp Gly Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Glu Thr Thr Arg Ala  
 275 280 285

Pro Ser Val Arg Arg Thr Arg Ser Arg Lys Ile Asp  
 290 295 300

<210> 115

<211> 13

<212> PRT

<213> Konsensus

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(13)

<223> Xaa in der Sequenz an der Position 2, 3, 4, 6, 7, 8 und 9 hat die  
 in Tabelle A wiedergegebene Bedeutung.

<400> 115

Asn Xaa Xaa Xaa His Xaa Xaa Met Tyr Xaa Tyr Tyr Xaa  
 1 5 10

<210> 116

<211> 10

<212> PRT

<213> Konsensus

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1)..(10)

<223> Xaa an der Position 3, 4, 5 und 6 in der Sequenz hat die in Tabel  
 le A wiedergegebene Bedeutung.

&lt;210&gt; 114

&lt;211&gt; 300

&lt;212&gt; PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

&lt;400&gt; 114

Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Phe Ala Ala Tyr  
 1 5 10 15

Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly  
 20 25 30

Ile Asp Asn Val Asp Ala Arg Glu Trp Ile Gly Ala Leu Ser Leu Arg  
 35 40 45

Leu Pro Ala Ile Ala Thr Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly  
 50 55 60

Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met  
 65 70 75 80

Leu Ala Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Ala Phe Asn Val Val Val Leu Gly  
 85 90 95

Met Phe Ala Arg Glu Ile Ser Gly Leu Gly Gln Pro Val Trp Gly Ser  
 100 105 110

Thr Met Pro Trp Ser Asp Arg Lys Ser Phe Lys Ile Leu Leu Gly Val  
 115 120 125

Trp Leu His Tyr Asn Asn Lys Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe  
 130 135 140

Met Val Ala Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr  
 145 150 155 160

His His Ala Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Leu Val Cys His Leu Met  
 165 170 175

Ala Thr Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Ala Cys Asn Ser  
 180 185 190

Phe Ile His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Leu Gly  
 195 200 205

Ile Arg Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Ile Thr Gln Ala Gln Met Leu Gln  
 210 215 220

atc gac aac gtc gac gcg cgc gag tgg atc ggt gcg ctg tcg ttg agg Ile Asp Asn Val Asp Ala Arg Glu Trp Ile Gly Ala Leu Ser Leu Arg 35 40 45	144
ctc ccg gcg atc gcg acg acg atg tac ctg ttg ttc tgc ctg gtc gga Leu Pro Ala Ile Ala Thr Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly 50 55 60	192
ccg agg ttg atg gcg aag cgc gag gcg ttc gac ccg aag ggg ttc atg Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met 65 70 75 80	240
ctg gcg tac aat gcg tat cag acg gcg ttc aac gtc gtc gtg ctc ggg Leu Ala Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Ala Phe Asn Val Val Val Leu Gly 85 90 95	288
atg ttc gcg cga gag atc tcg ggg ctg ggg cag ccc gtg tgg ggg tca Met Phe Ala Arg Glu Ile Ser Gly Leu Gly Gln Pro Val Trp Gly Ser 100 105 110	336
acc atg ccg tgg agc gat aga aaa tcg ttt aag atc ctc ctc ggg gtg Thr Met Pro Trp Ser Asp Arg Lys Ser Phe Lys Ile Leu Leu Gly Val 115 120 125	384
tgg ttg cac tac aac aac aaa tat ttg gag cta ttg gac act gtg ttc Trp Leu His Tyr Asn Asn Lys Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe 130 135 140	432
atg gtt gcg cgc aag aag acg aag cag ttg agc ttc ttg cac gtt tat Met Val Ala Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr 145 150 155 160	480
cat cac gcc ctg ttg atc tgg gcg tgg tgg ttg gtg tgt cac ttg atg His His Ala Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Leu Val Cys His Leu Met 165 170 175	528
gcc acg aac gat tgt atc gat gcc tac ttc ggc gcg gcg tgc aac tcg Ala Thr Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Ala Cys Asn Ser 180 185 190	576
ttc att cac atc gtg atg tac tcg tat tat ctc atg tcg gcg ctc ggc Phe Ile His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Leu Gly 195 200 205	624
att cga tgc ccg tgg aag cga tac atc acc cag gct caa atg ctc caa Ile Arg Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Ile Thr Gln Ala Gln Met Leu Gln 210 215 220	672
ttc gtc att gtc ttc gcg cac gcc gtg ttc gtg ctg cgt cag aag cac Phe Val Ile Val Phe Ala His Ala Val Phe Val Leu Arg Gln Lys His 225 230 235 240	720
tgc ccg gtc acc ctt cct tgg gcg caa atg ttc gtc atg acg aac atg Cys Pro Val Thr Leu Pro Trp Ala Gln Met Phe Val Met Thr Asn Met 245 250 255	768
ctc gtg ctc ttc ggg aac ttc tac ctc aag gcg tac tcg aac aag tcg Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Leu Lys Ala Tyr Ser Asn Lys Ser 260 265 270	816
cgc ggc gac ggc gcg agt tcc gtg aaa cca gcc gag acc acg cgc gcg Arg Gly Asp Gly Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Glu Thr Thr Arg Ala 275 280 285	864
ccc agc gtg cga cgc acg cga tct cga aaa att gac taa Pro Ser Val Arg Arg Thr Arg Ser Arg Lys Ile Asp 290 295 300	903



## 191

Tyr Glu Phe Val Asp Thr Tyr Ile Met Leu Leu Lys Asn Asn Leu Arg  
 145 150 155 160

Gln Val Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Ser Thr Ile Ser Phe Ile  
 165 170 175

Trp Trp Ile Ile Ala Arg Arg Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr Phe Ser  
 180 185 190

Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr Tyr Leu  
 195 200 205

Leu Ser Thr Leu Ile Gly Lys Glu Asp Pro Lys Arg Ser Asn Tyr Leu  
 210 215 220

Trp Trp Gly Arg His Leu Thr Gln Met Gln Met Leu Gln Phe Phe Phe  
 225 230 235 240

Asn Val Leu Gln Ala Leu Tyr Cys Ala Ser Phe Ser Thr Tyr Pro Lys  
 245 250 255

Phe Leu Ser Lys Ile Leu Leu Val Tyr Met Met Ser Leu Leu Gly Leu  
 260 265 270

Phe Gly His Phe Tyr Tyr Ser Lys His Ile Ala Ala Ala Lys Leu Gln  
 275 280 285

Lys Lys Gln Gln  
 290

<210> 113

<211> 903

<212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(903)

<223> Delta-5-Elongase

<400> 113

atg agc gcc tcc ggt gcg ctg ctg ccc gcg atc gcg ttc gcc gcg tac  
 Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Phe Ala Ala Tyr  
 1 5 10 15

48

gcg tac gcg acg tac gcc tac gcc ttt gag tgg tcg cac gcg aat gcc  
 Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly  
 20 25 30

96

## 190

Trp Trp Gly Arg His Leu Thr Gln Met Gln Met Leu Gln Phe Phe Phe  
 225 230 235 240  
 aac gta ctt caa gcg ttg tac tgc gct tgc ttc tct acg tat ccc aag 768  
 Asn Val Leu Gln Ala Leu Tyr Cys Ala Ser Phe Ser Thr Tyr Pro Lys  
 245 250 255  
 ttt ttg tcc aaa att ctg ctc gtc tat atg atg agc ctt ctc ggc ttg 816  
 Phe Leu Ser Lys Ile Leu Leu Val Tyr Met Met Ser Leu Leu Gly Leu  
 260 265 270  
 ttt ggg cat ttc tac tat tcc aag cac ata gca gca gct aag ctc cag 864  
 Phe Gly His Phe Tyr Tyr Ser Lys His Ile Ala Ala Lys Leu Gln  
 275 280 285  
 aaa aaa cag cag tga 879  
 Lys Lys Gln Gln  
 290

&lt;210&gt; 112

&lt;211&gt; 292

&lt;212&gt; PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

&lt;400&gt; 112

Met Ser Gly Leu Arg Ala Pro Asn Phe Leu His Arg Phe Trp Thr Lys  
 1 5 10 15

Trp Asp Tyr Ala Ile Ser Lys Val Val Phe Thr Cys Ala Asp Ser Phe  
 20 25 30

Gln Trp Asp Ile Gly Pro Val Ser Ser Ser Thr Ala His Leu Pro Ala  
 35 40 45

Ile Glu Ser Pro Thr Pro Leu Val Thr Ser Leu Leu Phe Tyr Leu Val  
 50 55 60

Thr Val Phe Leu Trp Tyr Gly Arg Leu Thr Arg Ser Ser Asp Lys Lys  
 65 70 75 80

Ile Arg Glu Pro Thr Trp Leu Arg Arg Phe Ile Ile Cys His Asn Ala  
 85 90 95

Phe Leu Ile Val Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Gly Cys Val Ala Gln  
 100 105 110

Ala Tyr Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Trp Gly Asn Glu Phe Lys Ala Thr  
 115 120 125

Glu Thr Gln Leu Ala Leu Tyr Ile Tyr Ile Phe Tyr Val Ser Lys Ile  
 130 135 140

189

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(879)

&lt;223&gt; Delta-6-Elongase

&lt;400&gt; 111

atg agt ggc tta cgt gca ccc aac ttt tta cac aga ttc tgg aca aag	48
Met Ser Gly Leu Arg Ala Pro Asn Phe Leu His Arg Phe Trp Thr Lys	
1 5 10 15	
tgg gac tac gcg att tcc aaa gtc gtc ttc acg tgt gcc gac agt ttt	96
Trp Asp Tyr Ala Ile Ser Lys Val Phe Thr Cys Ala Asp Ser Phe	
20 25 30	
cag tgg gac atc ggg cca gtg agt tgc agt acg gcg cat tta ccc gcc	144
Gln Trp Asp Ile Gly Pro Val Ser Ser Thr Ala His Leu Pro Ala	
35 40 45	
att gaa tcc cct acc cca ctg gtg act agc ctc ttg ttc tac tta gtc	192
Ile Glu Ser Pro Thr Pro Leu Val Thr Ser Leu Phe Tyr Leu Val	
50 55 60	
aca gtt ttc ttg tgg tat ggt cgt tta acc agg agt tca gac aag aaa	240
Thr Val Phe Leu Trp Tyr Gly Arg Leu Thr Arg Ser Ser Asp Lys	
65 70 75 80	
att aga gag cct acg tgg tta aga aga ttc ata ata tgt cat aat gcg	288
Ile Arg Glu Pro Thr Trp Leu Arg Arg Phe Ile Ile Cys His Asn Ala	
85 90 95	
ttc ttg ata gtc ctc agt ctt tac atg tgc ctt ggt tgt gtg gcc caa	336
Phe Leu Ile Val Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Gly Cys Val Ala Gln	
100 105 110	
gcg tat cag aat gga tat act tta tgg ggt aat gaa ttc aag gcc acg	384
Ala Tyr Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Trp Gly Asn Glu Phe Lys Ala Thr	
115 120 125	
gaa act cag ctt gct ctc tac att tac att ttt tac gta agt aaa ata	432
Glu Thr Gln Leu Ala Leu Tyr Ile Tyr Ile Phe Tyr Val Ser Lys Ile	
130 135 140	
tac gag ttt gta gat act tac att atg ctt ctc aag aat aac ttg cgg	480
Tyr Glu Phe Val Asp Thr Tyr Ile Met Leu Leu Lys Asn Asn Leu Arg	
145 150 155 160	
caa gta agt ttc cta cac att tat cac cac agc acg att tcc ttt att	528
Gln Val Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Ser Thr Ile Ser Phe Ile	
165 170 175	
tgg tgg atc att gct cgg agg gct ccg ggt ggt gat gct tac ttc agc	576
Trp Trp Ile Ile Ala Arg Arg Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr Phe Ser	
180 185 190	
gcg gcc ttg aac tca tgg gta cac gtg tgc atg tac acc tat tat cta	624
Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr Tyr Leu	
195 200 205	
tta tca acc ctt att gga aaa gaa gat cct aag cgt tcc aac tac ctt	672
Leu Ser Thr Leu Ile Gly Lys Glu Asp Pro Lys Arg Ser Asn Tyr Leu	
210 215 220	
tgg tgg ggt cgc cac cta acg caa atg cag atg ctt cag ttt ttc ttc	720

Ile Tyr Leu Met Gly Phe Ala Ser Thr Gly Arg Leu Gly Gln Asp Gly  
 225 230 235 240  
 Lys Glu Leu Gln Ala Gly Glu Ile Ile Asp His Tyr Arg Pro Trp Ser  
 245 250 255  
 Lys Met Phe Pro Thr Lys Leu Arg Phe Lys Ile Ala Leu Ser Thr Leu  
 260 265 270  
 Gly Val Ile Ala Ala Trp Val Gly Leu Tyr Phe Ala Ala Gln Glu Tyr  
 275 280 285  
 Gly Val Leu Pro Val Val Leu Trp Tyr Ile Gly Pro Leu Met Trp Asn  
 290 295 300  
 Gln Ala Trp Leu Val Leu Tyr Thr Trp Leu Gln His Asn Asp Pro Ser  
 305 310 315 320  
 Val Pro Gln Tyr Gly Ser Asp Glu Trp Thr Trp Val Lys Gly Ala Leu  
 325 330 335  
 Ser Thr Ile Asp Arg Pro Tyr Gly Ile Phe Asp Phe Phe His His Lys  
 340 345 350  
 Ile Gly Ser Thr His Val Ala His His Leu Phe His Glu Met Pro Phe  
 355 360 365  
 Tyr Lys Ala Asp Val Ala Thr Ala Ser Ile Lys Gly Phe Leu Glu Pro  
 370 375 380  
 Lys Gly Leu Tyr Asn Tyr Asp Pro Thr Pro Trp Tyr Val Ala Met Trp  
 385 390 395 400  
 Arg Val Ala Lys Thr Cys His Tyr Ile Glu Asp Val Asp Gly Val Gln  
 405 410 415  
 Tyr Tyr Lys Ser Leu Glu Asp Val Pro Leu Lys Lys Asp Ala Lys Lys  
 420 425 430  
 Ser Asp

&lt;210&gt; 111

&lt;211&gt; 879

&lt;212&gt; DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

&lt;210&gt; 110

&lt;211&gt; 434

&lt;212&gt; PRT

<213> *Thalassiosira pseudonana*

&lt;400&gt; 110

Met Gly Lys Gly Gly Arg Ser Val Thr Arg Ala Gln Thr Ala Glu Lys  
 1 5 10 15

Ser Ala His Thr Ile Gln Thr Phe Thr Asp Gly Arg Trp Val Ser Pro  
 20 25 30

Tyr Asn Pro Leu Ala Lys Asp Ala Pro Glu Leu Pro Ser Lys Gly Glu  
 35 40 45

Ile Lys Ala Val Ile Pro Lys Glu Cys Phe Glu Arg Ser Tyr Leu His  
 50 55 60

Ser Met Tyr Phe Val Leu Arg Asp Thr Val Met Ala Val Ala Cys Ala  
 65 70 75 80

Tyr Ile Ala His Ser Thr Leu Ser Thr Asp Ile Pro Ser Glu Leu Leu  
 85 90 95

Ser Val Asp Ala Leu Lys Trp Phe Leu Gly Trp Asn Thr Tyr Ala Phe  
 100 105 110

Trp Met Gly Cys Ile Leu Thr Gly His Trp Val Leu Ala His Glu Cys  
 115 120 125

Gly His Gly Ala Phe Ser Pro Ser Gln Thr Phe Asn Asp Phe Trp Gly  
 130 135 140

Phe Ile Met His Gln Ala Val Leu Val Pro Tyr Phe Ala Trp Gln Tyr  
 145 150 155 160

Ser His Ala Lys His His Arg Arg Thr Asn Asn Ile Met Asp Gly Glu  
 165 170 175

Ser His Val Pro Asn Ile Ala Lys Glu Met Gly Leu Asn Glu Lys Asn  
 180 185 190

Glu Arg Ser Gly Gly Tyr Ala Ala Ile His Glu Ala Ile Gly Asp Gly  
 195 200 205

Pro Phe Ala Met Phe Gln Ile Phe Ala His Leu Val Ile Gly Trp Pro  
 210 215 220

## 186

agc cat gtg ccc aat atc gcc aag gaa atg gga ttg aac gag aag aat 576  
 Ser His Val Pro Asn Ile Ala Lys Glu Met Gly Leu Asn Glu Lys Asn  
 180 185 190

gag cgc agt gga gga tat gcc gcc att cat gag gct att gga gat gga 624  
 Glu Arg Ser Gly Gly Tyr Ala Ala Ile His Glu Ala Ile Gly Asp Gly  
 195 200 205

ccc ttt gcg atg ttt caa atc ttt gct cac ttg gtg atc ggg tgg cct 672  
 Pro Phe Ala Met Phe Gln Ile Phe Ala His Leu Val Ile Gly Trp Pro  
 210 215 220

att tac ttg atg gga ttt gct tcc act gga cgt ctc ggt cag gat ggg 720  
 Ile Tyr Leu Met Gly Phe Ala Ser Thr Gly Arg Leu Gly Gln Asp Gly  
 225 230 235 240

aag gaa ctt cag gct gga gag atc atc gac cat tac cgt cct tgg agt 768  
 Lys Glu Leu Gln Ala Gly Glu Ile Ile Asp His Tyr Arg Pro Trp Ser  
 245 250 255

aag atg ttc ccc acc aag ttg cga ttc aaa att gct ctt tcg aca ctt 816  
 Lys Met Phe Pro Thr Lys Leu Arg Phe Lys Ile Ala Leu Ser Thr Leu  
 260 265 270

gga gtg att gcc gcc tgg gtt ggg ttg tac ttt gct gca caa gag tat 864  
 Gly Val Ile Ala Ala Trp Val Gly Leu Tyr Phe Ala Ala Gln Glu Tyr  
 275 280 285

gga gtc ttg ccc gtg gtt ctt tgg tac att ggc cca ctc atg tgg aat 912  
 Gly Val Leu Pro Val Val Leu Trp Tyr Ile Gly Pro Leu Met Trp Asn  
 290 295 300

cag gcg tgg ctt gtg ctc tac act tgg ctt cag cac aat gat ccc tcc 960  
 Gln Ala Trp Leu Val Leu Tyr Thr Trp Leu Gln His Asn Asp Pro Ser  
 305 310 315 320

gtg cct caa tat gga agt gac gaa tgg aca tgg gtc aag gga gct ttg 1008  
 Val Pro Gln Tyr Gly Ser Asp Glu Trp Thr Trp Val Lys Gly Ala Leu  
 325 330 335

tcg acg att gat cgc ccg tat ggt atc ttt gac ttc ttc cat cac aag 1056  
 Ser Thr Ile Asp Arg Pro Tyr Gly Ile Phe Asp Phe Phe His His Lys  
 340 345 350

att gga agc act cac gta gct cat cat ttg ttc cac gag atg cca ttt 1104  
 Ile Gly Ser Thr His Val Ala His His Leu Phe His Glu Met Pro Phe  
 355 360 365

tac aag gcg gat gtg gct act gcg tcg atc aag ggt ttc ttg gag ccg 1152  
 Tyr Lys Ala Asp Val Ala Thr Ala Ser Ile Lys Gly Phe Leu Glu Pro  
 370 375 380

aag gga ctt tac aac tat gat cca acg cct tgg tat gtg gcc atg tgg 1200  
 Lys Gly Leu Tyr Asn Tyr Asp Pro Thr Pro Trp Tyr Val Ala Met Trp  
 385 390 395 400

agg gtg gcc aag act tgt cat tat att gag gat gtg gat gga gtt cag 1248  
 Arg Val Ala Lys Thr Cys His Tyr Ile Glu Asp Val Asp Gly Val Gln  
 405 410 415

tat tat aag agt ttg gag gat gtg cct ttg aag aag gat gcc aag aag 1296  
 Tyr Tyr Lys Ser Leu Glu Asp Val Pro Leu Lys Lys Asp Ala Lys Lys  
 420 425 430

tct gat tag  
 Ser Asp 1305

185

Thr Asp Lys Gln Leu Pro Val Ala Ala  
 355 360

&lt;210&gt; 109

&lt;211&gt; 1305

&lt;212&gt; DNA

<213> *Thalassiosira pseudonana*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1305)

&lt;223&gt; Delta-12-Desaturase

&lt;400&gt; 109

atg gga aag gga gga aga tca gta acc cgc gct caa aca gca gaa aag	48
Met Gly Lys Gly Gly Arg Ser Val Thr Arg Ala Gln Thr Ala Glu Lys	
1 5 10 15	
tca gca cac acc atc caa acc ttc acc gac ggc cga tgg gtc tcc ccc	96
Ser Ala His Thr Ile Gln Thr Phe Thr Asp Gly Arg Trp Val Ser Pro	
20 25 30	
tac aac ccc ctc gca aaa gat gca cct gaa ctc ccc tcc aag ggt gaa	144
Tyr Asn Pro Leu Ala Lys Asp Ala Pro Glu Leu Pro Ser Lys Gly Glu	
35 40 45	
atc aag gcg gtc atc ccc aaa gag tgc ttc gaa cga agc tac ctc cac	192
Ile Lys Ala Val Ile Pro Lys Glu Cys Phe Glu Arg Ser Tyr Leu His	
50 55 60	
tcc atg tac ttc gtc ctc cgt gac acc gtc atg gcc gtg gcc tgc gcc	240
Ser Met Tyr Phe Val Leu Arg Asp Thr Val Met Ala Val Ala Cys Ala	
65 70 75 80	
tac atc gcc cac tca acg ctc tcc acc gat att ccc tcc gag tta ctg	288
Tyr Ile Ala His Ser Thr Leu Ser Thr Asp Ile Pro Ser Glu Leu Leu	
85 90 95	
agc gtg gac gca ctc aaa tgg ttc ctc gga tgg aac acc tac gcc ttt	336
Ser Val Asp Ala Leu Lys Trp Phe Leu Gly Trp Asn Thr Tyr Ala Phe	
100 105 110	
tgg atg ggg tgc att ctc acc gga cac tgg gtc cta gcc cat gaa tgt	384
Trp Met Gly Cys Ile Leu Thr Gly His Trp Val Leu Ala His Glu Cys	
115 120 125	
gga cat ggt gca ttc tct ccc tct cag acg ttt aat gac ttt tgg ggg	432
Gly His Gly Ala Phe Ser Pro Ser Gln Thr Phe Asn Asp Phe Trp Gly	
130 135 140	
ttc att atg cat cag gcg gtg ttg gtt ccg tat ttc gcc tgg cag tac	480
Phe Ile Met His Gln Ala Val Leu Val Pro Tyr Phe Ala Trp Gln Tyr	
145 150 155 160	
tct cat gcg aag cat cat cga cgt acc aac aac att atg gat ggg gag	528
Ser His Ala Lys His His Arg Arg Thr Asn Asn Ile Met Asp Gly Glu	
165 170 175	

## 184

Asn Lys Thr Leu Gln Asp Ala Val Gly Tyr Val Leu His Ser Leu Leu  
                                     85                                    90                                    95

Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Gln Arg Ser His Ala Val His His Ser  
                                     100                                    105                                    110

Arg Thr Asn His Val Leu Glu Gly Glu Thr His Val Pro Ala Arg Leu  
                                     115                                    120                                    125

Gly Thr Glu Asp Ala Asn Val Val Phe Lys Leu Arg Glu Leu Ile Gly  
                                     130                                    135                                    140

Glu Gly Pro Phe Thr Phe Phe Asn Leu Val Gly Val Phe Ala Leu Gly  
                                     145                                    150                                    155                                    160

Trp Pro Ile Tyr Leu Leu Thr Gly Ala Ser Gly Gly Pro Val Arg Gly  
                                     165                                    170                                    175

Asn Thr Asn His Phe Leu Pro Phe Met Gly Glu Lys Gly Lys His Ala  
                                     180                                    185                                    190

Leu Phe Pro Gly Lys Trp Ala Lys Lys Val Trp Gln Ser Asp Ile Gly  
                                     195                                    200                                    205

Val Val Ala Val Leu Gly Ala Leu Ala Ala Trp Ala Ala His Ser Gly  
                                     210                                    215                                    220

Ile Ala Thr Val Met Ala Leu Tyr Val Gly Pro Tyr Met Val Thr Asn  
                                     225                                    230                                    235                                    240

Phe Trp Leu Val Leu Tyr Thr Trp Leu Gln His Thr Asp Val Asp Val  
                                     245                                    250                                    255

Pro His Phe Glu Gly Asp Asp Trp Asn Leu Val Lys Gly Ala Phe Met  
                                     260                                    265                                    270

Thr Ile Asp Arg Pro Tyr Gly Pro Val Phe Asp Phe Leu His His Arg  
                                     275                                    280                                    285

Ile Gly Ser Thr His Val Ala His His Ile Asn Thr Pro Phe Pro His  
                                     290                                    295                                    300

Tyr Lys Ala Gln Met Ala Thr Asp Ala Leu Lys Glu Ala Tyr Pro Asp  
                                     305                                    310                                    315                                    320

Leu Tyr Leu Tyr Asp Pro Thr Pro Ile Ala Thr Ala Thr Trp Arg Val  
                                     325                                    330                                    335

Gly Ser Lys Cys Ile Ala Val Val Lys Lys Gly Asp Glu Trp Val Phe  
                                     340                                    345                                    350



## 183

Ile Ala Thr Val Met Ala Leu Tyr Val Gly Pro Tyr Met Val Thr Asn  
 225 230 235 240  
 ttt tgg ctc gtc ttg tac acg tgg tta cag cac acc gac gtt gac gtg 768  
 Phe Trp Leu Val Leu Tyr Thr Trp Leu Gln His Thr Asp Val Asp Val  
 245 250 255  
 ccg cac ttc gag ggc gac gat tgg aac ttg gtc aag ggg gca ttc atg 816  
 Pro His Phe Glu Gly Asp Asp Trp Asn Leu Val Lys Gly Ala Phe Met  
 260 265 270  
 acg atc gat cgc ccg tac ggc cca gtt ttt gat ttc ttg cac cac cgc 864  
 Thr Ile Asp Arg Pro Tyr Gly Pro Val Phe Asp Phe Leu His His Arg  
 275 280 285  
 atc ggc agc acg cac gtc gcg cac cac atc aac aca cca ttc ccg cat 912  
 Ile Gly Ser Thr His Val Ala His His Ile Asn Thr Pro Phe Pro His  
 290 295 300  
 tac aag gct caa atg gcg acg gat gcg cta aag gag gcg tat ccc gac 960  
 Tyr Lys Ala Gln Met Ala Thr Asp Ala Leu Lys Glu Ala Tyr Pro Asp  
 305 310 315 320  
 ctc tac ctt tac gat cca act ccg atc gcg acc gct acg tgg cgc gtg 1008  
 Leu Tyr Leu Tyr Asp Pro Thr Pro Ile Ala Thr Ala Thr Trp Arg Val  
 325 330 335  
 ggg agc aag tgc atc gcc gtc gtg aag aag gga gac gaa tgg gtg ttc 1056  
 Gly Ser Lys Cys Ile Ala Val Val Lys Lys Gly Asp Glu Trp Val Phe  
 340 345 350  
 acg gat aag caa ctc ccg gtc gcg gcg tga 1086  
 Thr Asp Lys Gln Leu Pro Val Ala Ala  
 355 360  
 <210> 108  
 <211> 361  
 <212> PRT  
 <213> *Ostreococcus tauri*  
 <400> 108  
 Met Gln Glu Gly Val Arg Asn Ile Pro Asn Glu Cys Phe Glu Thr Gly  
 1 5 10 15  
 His Leu Glu Arg Pro Trp Arg Ser Gly Arg Cys Gly Arg Asp Pro Gly  
 20 25 30  
 Ser Asn Trp Gly Ala Gly Phe Arg Phe Phe Ser Leu Lys Gly Phe Trp  
 35 40 45  
 Trp Pro Ala Trp Trp Ala Tyr Ala Phe Val Thr Gly Thr Ala Ala Thr  
 50 55 60  
 Gly Cys Trp Val Ala Ala His Glu Cys Gly His Gly Ala Phe Ser Asp  
 65 70 75 80

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1086)

&lt;223&gt; Delta-12-Desaturase

&lt;400&gt; 107

atg cag gag ggg gtg cga aac att ccg aac gag tgc ttt gag acg gga	48
Met Gln Glu Gly Val Arg Asn Ile Pro Asn Glu Cys Phe Glu Thr Gly	
1 5 10 15	
cat ctt gaa aga ccc tgg cgt tcc ggc cgg tgt ggg cgc gat ccc ggt	96
His Leu Glu Arg Pro Trp Arg Ser Gly Arg Cys Gly Arg Asp Pro Gly	
20 25 30	
tcg aat tgg ggc gct ggc ttc cgc ttt ttt tgc ctc aag ggg ttt tgg	144
Ser Asn Trp Gly Ala Gly Phe Arg Phe Phe Ser Leu Lys Gly Phe Trp	
35 40 45	
tgg ccg gcg tgg tgg gcg tac gcg ttc gtg acg ggg acg gcg gcc act	192
Trp Pro Ala Trp Trp Ala Tyr Ala Phe Val Thr Gly Thr Ala Ala Thr	
50 55 60	
ggg tgt tgg gtc gcc gcg cac gag tgc ggg cac ggc gcg ttc agc gat	240
Gly Cys Trp Val Ala Ala His Glu Cys Gly His Gly Ala Phe Ser Asp	
65 70 75 80	
aac aag acg ttg caa gat gcg gtt gga tac gtg ttg cac tcg ttg ctc	288
Asn Lys Thr Leu Gln Asp Ala Val Gly Tyr Val Leu His Ser Leu Leu	
85 90 95	
ttg gtg ccg tac ttt tct tgg cag cga tca cac gcg gtg cat cac tcg	336
Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Gln Arg Ser His Ala Val His His Ser	
100 105 110	
agg acg aat cac gtt ctt gag ggc gag acg cac gtg ccg gcg cgc ttg	384
Arg Thr Asn His Val Leu Glu Gly Glu Thr His Val Pro Ala Arg Leu	
115 120 125	
ggg acg gaa gac gcc aac gtc gtg ttc aag ctt cgc gaa ttg atc ggt	432
Gly Thr Glu Asp Ala Asn Val Val Phe Lys Leu Arg Glu Leu Ile Gly	
130 135 140	
gaa ggg ccg ttc acg ttt ttc aac ctc gtc ggc gtc ttc gcg ctc gga	480
Glu Gly Pro Phe Thr Phe Phe Asn Leu Val Gly Val Phe Ala Leu Gly	
145 150 155 160	
tgg ccg att tac ttg ctc acc ggc gcg agc ggc gga ccg gtg cgc ggt	528
Trp Pro Ile Tyr Leu Leu Thr Gly Ala Ser Gly Gly Pro Val Arg Gly	
165 170 175	
aac acg aac cac ttc tta ccc ttc atg ggc gag aaa ggt aag cac gcg	576
Asn Thr Asn His Phe Leu Pro Phe Met Gly Glu Lys Gly Lys His Ala	
180 185 190	
ctg ttc ccg ggt aag tgg gcg aag aag gtg tgg cag tct gac atc ggc	624
Leu Phe Pro Gly Lys Trp Ala Lys Lys Val Trp Gln Ser Asp Ile Gly	
195 200 205	
gtt gtt gcc gtc ctg ggc gcg ctc gcg gct tgg gcg gcg cac agc ggg	672
Val Val Ala Val Leu Gly Ala Leu Ala Ala Trp Ala Ala His Ser Gly	
210 215 220	
att gcc aca gtg atg gca ctc tac gtc ggc ccg tac atg gtg acc aac	720

Phe Asp Asp Ile Pro Gln Leu Tyr Lys Thr Phe Gly Tyr Asn Pro Arg  
 210 215 220  
 Met Met Gln Leu Pro Phe Leu Tyr Phe Met Tyr Leu Ala Leu Gly Ile  
 225 230 235 240  
 Pro Asp Gly Gly His Val Val Phe Tyr Gly Arg Met Trp Glu Gly Val  
 245 250 255  
 Ser Leu Gln Lys Lys Phe Asp Ala Ala Ile Ser Val Ala Val Ser Cys  
 260 265 270  
 Ala Thr Ala Gly Ser Leu Trp Met Asn Met Gly Thr Ala Asp Phe Thr  
 275 280 285  
 Val Val Cys Met Val Pro Trp Leu Val Leu Ser Trp Trp Leu Phe Met  
 290 295 300  
 Val Thr Tyr Leu Gln His His Ser Glu Asp Gly Lys Leu Tyr Thr Asp  
 305 310 315 320  
 Glu Thr Phe Thr Phe Glu Lys Gly Ala Phe Glu Thr Val Asp Arg Ser  
 325 330 335  
 Tyr Gly Lys Leu Ile Asn Arg Met Ser His His Met Met Asp Gly His  
 340 345 350  
 Val Val His His Leu Phe Phe Glu Arg Val Pro His Tyr Arg Leu Glu  
 355 360 365  
 Ala Ala Thr Glu Ala Leu Val Lys Gly Met Asp Glu Thr Gly Gln Lys  
 370 375 380  
 His Leu Tyr Lys Tyr Ile Asp Thr Pro Asp Phe Asn Ala Glu Ile Val  
 385 390 395 400  
 Asn Gly Phe Arg Asp Asn Trp Phe Leu Val Glu Glu Glu Asn Ile Lys  
 405 410 415  
 Arg Glu

&lt;210&gt; 107

&lt;211&gt; 1086

&lt;212&gt; DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

agg gag tag  
Arg Glu

1257

&lt;210&gt; 106

&lt;211&gt; 418

&lt;212&gt; PRT

<213> *Thalassiosira pseudonana*

&lt;400&gt; 106

Met Tyr Arg Leu Thr Ser Thr Phe Leu Ile Ala Leu Ala Phe Ser Ser  
1 5 10 15

Ser Ile Asn Ala Phe Ser Pro Gln Arg Pro Pro Arg Thr Ile Thr Lys  
20 25 30

Ser Lys Val Gln Ser Thr Val Leu Pro Ile Pro Thr Lys Asp Asp Leu  
35 40 45

Asn Phe Leu Gln Pro Gln Leu Asp Glu Asn Asp Leu Tyr Leu Asp Asp  
50 55 60

Val Asn Thr Pro Pro Arg Ala Gly Thr Ile Met Lys Met Leu Pro Lys  
65 70 75 80

Glu Thr Phe Asn Ile Asp Thr Ala Thr Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Met  
85 90 95

Asp Met Ala Ala Val Val Ser Ser Met Thr Leu Leu Asn Ala Ile Val  
100 105 110

Thr Ser Asp Gln Tyr His Ala Leu Pro Leu Pro Leu Gln Ala Ala Thr  
115 120 125

Val Ile Pro Phe Gln Leu Leu Ala Gly Phe Ala Met Trp Cys Met Trp  
130 135 140

Cys Ile Gly His Asp Ala Gly His Ser Thr Val Ser Lys Thr Lys Trp  
145 150 155 160

Ile Asn Arg Val Val Gly Glu Val Ala His Ser Val Val Cys Leu Thr  
165 170 175

Pro Phe Val Pro Trp Gln Met Ser His Arg Lys His His Leu Asn His  
180 185 190

Asn His Ile Glu Lys Asp Tyr Ser His Lys Trp Tyr Ser Arg Asp Glu  
195 200 205

179

tgc att gga cac gat gct gga cat tct act gtt tgc aag aca aag tgg Cys Ile Gly His Asp Ala Gly His Ser Thr Val Ser Lys Thr Lys Trp 145 150 155 160	480
atc aac cga gtc gtt ggt gaa gtg gct cat tct gtt gtt tgt ctc acg Ile Asn Arg Val Val Gly Glu Val Ala His Ser Val Val Cys Leu Thr 165 170 175	528
ccg ttc gtg cct tgg cag atg tgc cat agg aaa cac cat ttg aat cac Pro Phe Val Pro Trp Gln Met Ser His Arg Lys His His Leu Asn His 180 185 190	576
aat cat att gaa aag gac tac tct cat aag tgg tac agt cgc gac gag Asn His Ile Glu Lys Asp Tyr Ser His Lys Trp Tyr Ser Arg Asp Glu 195 200 205	624
ttt gat gat atc cca caa ctc tat aag aca ttt ggc tac aac cca aga Phe Asp Asp Ile Pro Gln Leu Tyr Lys Thr Phe Gly Tyr Asn Pro Arg 210 215 220	672
atg atg caa ctt cca ttc ctc tac ttc atg tat ctt gca ttg gga att Met Met Gln Leu Pro Phe Leu Tyr Phe Met Tyr Leu Ala Leu Gly Ile 225 230 235 240	720
cca gat ggt ggg cat gtt gtg ttc tac gga aga atg tgg gaa gga gtg Pro Asp Gly Gly His Val Val Phe Tyr Gly Arg Met Trp Glu Gly Val 245 250 255	768
tca ttg cag aag aag ttt gat gct gct att tct gtg gcc gta tca tgt Ser Leu Gln Lys Lys Phe Asp Ala Ala Ile Ser Val Ala Val Ser Cys 260 265 270	816
gca act gct gga tgc ctt tgg atg aat atg ggt aca gca gac ttc acg Ala Thr Ala Gly Ser Leu Trp Met Asn Met Gly Thr Ala Asp Phe Thr 275 280 285	864
gtg gta tgc atg gtt cct tgg cta gtt cta tgc tgg tgg ctc ttc atg Val Val Cys Met Val Pro Trp Leu Val Leu Ser Trp Trp Leu Phe Met 290 295 300	912
gta aca tac ctt cag cat cat tca gaa gac gga aag cta tac act gat Val Thr Tyr Leu Gln His His Ser Glu Asp Gly Lys Leu Tyr Thr Asp 305 310 315 320	960
gaa acg ttt aca ttt gaa aag gga gcc ttc gag acc gtg gat cgt tgc Glu Thr Phe Thr Phe Glu Lys Gly Ala Phe Glu Thr Val Asp Arg Ser 325 330 335	1008
tac ggc aag ttg atc aac cga atg tgc cat cac atg atg gac ggt cac Tyr Gly Lys Leu Ile Asn Arg Met Ser His His Met Met Asp Gly His 340 345 350	1056
gtg gtg cac cac ttg ttc ttt gaa cgt gta cct cac tac aga tta gag Val Val His His Leu Phe Phe Glu Arg Val Pro His Tyr Arg Leu Glu 355 360 365	1104
gca gct acc gaa gct ctt gtg aaa gga atg gat gaa acg gga cag aaa Ala Ala Thr Glu Ala Leu Val Lys Gly Met Asp Glu Thr Gly Gln Lys 370 375 380	1152
cat ttg tac aaa tac att gat act cct gat ttc aat gcc gag att gtc His Leu Tyr Lys Tyr Ile Asp Thr Pro Asp Phe Asn Ala Glu Ile Val 385 390 395 400	1200
aac gga ttt cgc gac aat tgg ttc ctt gtt gaa gag gag aac atc aaa Asn Gly Phe Arg Asp Asn Trp Phe Leu Val Glu Glu Glu Asn Ile Lys 405 410 415	1248

178

Val Val Glu Ser Thr Cys Ala Glu Tyr Gly Val Pro Tyr Gln Ser Glu  
465 470 475 480

Ser Asn Leu Phe Val Ala Tyr Gly Lys Met Ile Ser His Leu Lys Phe  
485 490 495

Leu Gly Lys Ala Lys Cys Glu  
500

&lt;210&gt; 105

&lt;211&gt; 1257

&lt;212&gt; DNA

<213> *Thalassiosira pseudonana*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1257)

&lt;223&gt; Omega-3-Desaturase

&lt;400&gt; 105

atg tac aga tta aca tcc acc ttc ctc atc gca ttg gca ttc tcc tcc 48  
Met Tyr Arg Leu Thr Ser Thr Phe Leu Ile Ala Leu Ala Phe Ser Ser  
1 5 10 15

tcc atc aat gcc ttc tct cca caa cgg cca cca cgt act atc acc aaa 96  
Ser Ile Asn Ala Phe Ser Pro Gln Arg Pro Pro Arg Thr Ile Thr Lys  
20 25 30

agt aaa gtc caa agc acc gtg cta ccc ata ccg acc aag gat gat ctg 144  
Ser Lys Val Gln Ser Thr Val Leu Pro Ile Pro Thr Lys Asp Asp Leu  
35 40 45

aac ttt ctc caa cca caa ctc gat gag aat gat ctc tac ctc gac gat 192  
Asn Phe Leu Gln Pro Gln Leu Asp Glu Asn Asp Leu Tyr Leu Asp Asp  
50 55 60

gtc aac act cca cca aga gca ggt acc atc atg aag atg ttg ccg aag 240  
Val Asn Thr Pro Pro Arg Ala Gly Thr Ile Met Lys Met Leu Pro Lys  
65 70 75 80

gaa acg ttc aac att gat aca gca act tca ttg ggt tac ttt ggt atg 288  
Glu Thr Phe Asn Ile Asp Thr Ala Thr Ser Leu Gly Tyr Phe Gly Met  
85 90 95

gat atg gca gcg gtt gta tcg tcc atg acg ttg cta aat gct att gta 336  
Asp Met Ala Ala Val Val Ser Ser Met Thr Leu Leu Asn Ala Ile Val  
100 105 110

act tcg gat cag tac cat gct ctt cca ctt cct ctc caa gca gca aca 384  
Thr Ser Asp Gln Tyr His Ala Leu Pro Leu Pro Leu Gln Ala Ala Thr  
115 120 125

gtg att ccc ttt cag cta ttg gct ggg ttc gcc atg tgg tgt atg tgg 432  
Val Ile Pro Phe Gln Leu Leu Ala Gly Phe Ala Met Trp Cys Met Trp  
130 135 140

## 177

Gly Met Gly Thr Phe Ala Ala Phe Ile Gly Thr Cys Ile Gln His Asp  
 195 200 205

Gly Asn His Gly Ala Phe Ala Gln Asn Lys Leu Leu Asn Lys Leu Ala  
 210 215 220

Gly Trp Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Phe Thr Trp Glu Leu  
 225 230 235 240

Gln His Met Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Val Leu Asp Gly Val  
 245 250 255

Glu Glu Glu Arg Lys Glu Arg Gly Glu Asp Val Ala Leu Glu Glu Lys  
 260 265 270

Asp Gln Asp Phe Glu Val Ala Thr Ser Gly Arg Leu Tyr His Ile Asp  
 275 280 285

Ala Asn Val Arg Tyr Gly Ser Val Trp Asn Val Met Arg Phe Trp Ala  
 290 295 300

Met Lys Val Ile Thr Met Gly Tyr Met Met Gly Leu Pro Ile Tyr Phe  
 305 310 315 320

His Gly Val Leu Arg Gly Val Gly Leu Phe Val Ile Gly His Leu Ala  
 325 330 335

Cys Gly Glu Leu Leu Ala Thr Met Phe Ile Val Asn His Val Ile Glu  
 340 345 350

Gly Val Ser Tyr Gly Thr Lys Asp Leu Val Gly Gly Ala Ser His Val  
 355 360 365

Asp Glu Lys Lys Ile Val Lys Pro Thr Thr Val Leu Gly Asp Thr Pro  
 370 375 380

Met Val Lys Thr Arg Glu Glu Ala Leu Lys Ser Asn Ser Asn Asn Asn  
 385 390 395 400

Lys Lys Lys Gly Glu Lys Asn Ser Val Pro Ser Val Pro Phe Asn Asp  
 405 410 415

Trp Ala Ala Val Gln Cys Gln Thr Ser Val Asn Trp Ser Pro Gly Ser  
 420 425 430

Trp Phe Trp Asn His Phe Ser Gly Gly Leu Ser His Gln Ile Glu His  
 435 440 445

His Leu Phe Pro Ser Ile Cys His Thr Asn Tyr Cys His Ile Gln Asp  
 450 455 460

Ser Asn Leu Phe Val Ala Tyr Gly Lys Met Ile Ser His Leu Lys Phe  
485 490 495

1512

<213> Thalassiosira pseudonana

Met Cys Asn Gly Asn Leu Pro Ala Ser Thr Ala Gln Leu Lys Ser Thr  
1 5 10 15

Ser Lys Pro Gln Gln Gln His Glu His Arg Thr Ile Ser Lys Ser Glu  
20 25 30

Leu Ala Gln His Asn Thr Pro Lys Ser Ala Trp Cys Ala Val His Ser  
35 40 45

Thr Pro Ala Thr Asp Pro Ser His Ser Asn Asn Lys Gln His Ala His  
50 55 60

Leu Val Leu Asp Ile Thr Asp Phe Ala Ser Arg His Pro Gly Gly Asp  
65 70 75 80

Leu Ile Leu Leu Ala Ser Gly Lys Asp Ala Ser Val Leu Phe Glu Thr  
85 90 95

Tyr His Pro Arg Gly Val Pro Thr Ser Leu Ile Gln Lys Leu Gln Ile  
100 105 110

Gly Val Met Glu Glu Glu Ala Phe Arg Asp Ser Phe Tyr Ser Trp Thr  
115 120 125

Asp Ser Asp Phe Tyr Thr Val Leu Lys Arg Arg Val Val Glu Arg Leu  
130 135 140

Glu Glu Arg Gly Leu Asp Arg Arg Gly Ser Lys Glu Ile Trp Ile Lys  
145 150 155 160

Ala Leu Phe Leu Leu Val Gly Phe Trp Tyr Cys Leu Tyr Lys Met Tyr  
165 170 175

Thr Thr Ser Asp Ile Asp Gln Tyr Gly Ile Ala Ile Ala Tyr Ser Ile  
180 185 190



## 175

Gly Asn His Gly Ala Phe Ala Gln Asn Lys Leu Leu Asn Lys Leu Ala	
210 215 220	
ggg tgg acg ttg gat atg att ggt gcg agt gcg ttt acg tgg gag ctt	720
Gly Trp Thr Leu Asp Met Ile Gly Ala Ser Ala Phe Thr Trp Glu Leu	
225 230 235 240	
cag cac atg ctg ggg cat cat cca tat acg aat gtg ttg gat ggg gtg	768
Gln His Met Leu Gly His His Pro Tyr Thr Asn Val Leu Asp Gly Val	
245 250 255	
gag gag gag agg aag gag agg ggg gag gat gtt gct ttg gaa gaa aag	816
Glu Glu Glu Arg Lys Glu Arg Gly Glu Asp Val Ala Leu Glu Glu Lys	
260 265 270	
gat cag gat ttt gaa gtt gcc aca tcc gga cga tta tat cat att gat	864
Asp Gln Asp Phe Glu Val Ala Thr Ser Gly Arg Leu Tyr His Ile Asp	
275 280 285	
gcc aat gta cgt tat ggt tcg gta tgg aat gtc atg agg ttt tgg gct	912
Ala Asn Val Arg Tyr Gly Ser Val Trp Asn Val Met Arg Phe Trp Ala	
290 295 300	
atg aag gtc att acg atg gga tat atg atg gga tta cca atc tac ttt	960
Met Lys Val Ile Thr Met Gly Tyr Met Met Gly Leu Pro Ile Tyr Phe	
305 310 315 320	
cat gga gta ctg agg gga gtt gga ttg ttt gtt att ggg cat ttg gcg	1008
His Gly Val Leu Arg Gly Val Gly Leu Phe Val Ile Gly His Leu Ala	
325 330 335	
tgt gga gag ttg ttg gcg acg atg ttt att gtg aat cac gtc att gag	1056
Cys Gly Glu Leu Leu Ala Thr Met Phe Ile Val Asn His Val Ile Glu	
340 345 350	
ggg gtg agt tat gga acg aag gat ttg gtt ggt ggt gcg agt cat gta	1104
Gly Val Ser Tyr Gly Thr Lys Asp Leu Val Gly Gly Ala Ser His Val	
355 360 365	
gat gag aag aag att gtc aag cca acg act gta ttg gga gat aca cca	1152
Asp Glu Lys Lys Ile Val Lys Pro Thr Thr Val Leu Gly Asp Thr Pro	
370 375 380	
atg gta aag act cgc gag gag gca ttg aaa agc aac agc aat aac aac	1200
Met Val Lys Thr Arg Glu Glu Ala Leu Lys Ser Asn Ser Asn Asn Asn	
385 390 395 400	
aag aag aag gga gag aag aac tcg gta cca tcc gtt cca ttc aac gac	1248
Lys Lys Lys Gly Glu Lys Asn Ser Val Pro Ser Val Pro Phe Asn Asp	
405 410 415	
tgg gca gca gtc caa tgc cag acc tcc gtg aat tgg tct cca ggc tca	1296
Trp Ala Ala Val Gln Cys Gln Thr Ser Val Asn Trp Ser Pro Gly Ser	
420 425 430	
tgg ttc tgg aat cac ttt tct ggg gga ctc tct cat cag att gag cat	1344
Trp Phe Trp Asn His Phe Ser Gly Gly Leu Ser His Gln Ile Glu His	
435 440 445	
cac ttg ttc ccc agc att tgt cat aca aac tac tgt cat atc cag gat	1392
His Leu Phe Pro Ser Ile Cys His Thr Asn Tyr Cys His Ile Gln Asp	
450 455 460	
gtt gtg gag agt acg tgt gct gag tac gga gtt ccg tat cag agt gag	1440
Val Val Glu Ser Thr Cys Ala Glu Tyr Gly Val Pro Tyr Gln Ser Glu	
465 470 475 480	
agt aat ttg ttt gtt gct tat gga aag atg att agt cat ttg aag ttt	1488

174

<213> *Thalassiosira pseudonana*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1512)

&lt;223&gt; Delta-4-Desaturase

&lt;400&gt; 103

atg tgc aac ggc aac ctc cca gca tcc acc gca cag ctc aag tcc acc	48
Met Cys Asn Gly Asn Leu Pro Ala Ser Thr Ala Gln Leu Lys Ser Thr	
1 5 10 15	
tcg aag ccc cag cag caa cat gag cat cgc acc atc tcc aag tcc gag	96
Ser Lys Pro Gln Gln Gln His Glu His Arg Thr Ile Ser Lys Ser Glu	
20 25 30	
ctc gcc caa cac aac acg ccc aaa tca gca tgg tgt gcc gtc cac tcc	144
Leu Ala Gln His Asn Thr Pro Lys Ser Ala Trp Cys Ala Val His Ser	
35 40 45	
act ccc gcc acc gac cca tcc cac tcc aac aac aaa caa cac gca cac	192
Thr Pro Ala Thr Asp Pro Ser His Ser Asn Asn Lys Gln His Ala His	
50 55 60	
cta gtc ctc gac att acc gac ttt gcg tcc cgc cat cca ggg gga gac	240
Leu Val Leu Asp Ile Thr Asp Phe Ala Ser Arg His Pro Gly Gly Asp	
65 70 75 80	
ctc atc ctc ctc gct tcc ggc aaa gac gcc tcg gtg ctg ttt gaa aca	288
Leu Ile Leu Leu Ala Ser Gly Lys Asp Ala Ser Val Leu Phe Glu Thr	
85 90 95	
tac cat cca cgt gga gtt ccg acg tct ctc att caa aag ctg cag att	336
Tyr His Pro Arg Gly Val Pro Thr Ser Leu Ile Gln Lys Leu Gln Ile	
100 105 110	
gga gtg atg gag gag gag gcg ttt cgg gat tcg ttt tac agt tgg act	384
Gly Val Met Glu Glu Glu Ala Phe Arg Asp Ser Phe Tyr Ser Trp Thr	
115 120 125	
gat tct gac ttt tat act gtg ttg aag agg agg gtt gtg gag cgg ttg	432
Asp Ser Asp Phe Tyr Thr Val Leu Lys Arg Arg Val Val Glu Arg Leu	
130 135 140	
gag gag agg ggg ttg gac agg agg gga tcg aaa gag att tgg atc aag	480
Glu Glu Arg Gly Leu Asp Arg Arg Gly Ser Lys Glu Ile Trp Ile Lys	
145 150 155 160	
gct ttg ttc ttg ttg gtt gga ttt tgg tac tgt ttg tac aag atg tat	528
Ala Leu Phe Leu Leu Val Gly Phe Trp Tyr Cys Leu Tyr Lys Met Tyr	
165 170 175	
act acg tcg gat atc gat cag tac ggt att gcc att gcc tat tct att	576
Thr Thr Ser Asp Ile Asp Gln Tyr Gly Ile Ala Ile Ala Tyr Ser Ile	
180 185 190	
gga atg gga acc ttt gcg gca ttc atc ggc acg tgt att caa cac gat	624
Gly Met Gly Thr Phe Ala Ala Phe Ile Gly Thr Cys Ile Gln His Asp	
195 200 205	
gga aat cac ggt gca ttc gct cag aac aag tta ctc aac aag ttg gct	672

173

Tyr Pro Ile Gly His Pro Lys Arg Lys Trp Trp His Arg Phe Gln Gly  
 260 265 270

Leu Tyr Phe Leu Ile Met Leu Ser Phe Tyr Trp Val Ser Met Val Phe  
 275 280 285

Asn Pro Gln Val Ile Asp Leu Arg His Ala Gly Ala Ala Tyr Val Gly  
 290 295 300

Phe Gln Met Glu Asn Asp Phe Ile Val Lys Arg Arg Lys Tyr Ala Met  
 305 310 315 320

Ala Leu Arg Ala Met Tyr Phe Tyr Phe Asn Ile Tyr Cys Pro Ile Val  
 325 330 335

Asn Asn Gly Leu Thr Trp Ser Thr Val Gly Ile Ile Leu Leu Met Gly  
 340 345 350

Val Ser Glu Ser Phe Met Leu Ser Gly Leu Phe Val Leu Ser His Asn  
 355 360 365

Phe Glu Asn Ser Glu Arg Asp Pro Thr Ser Glu Tyr Arg Lys Thr Gly  
 370 375 380

Glu Gln Val Cys Trp Phe Lys Ser Gln Val Glu Thr Ser Ser Thr Tyr  
 385 390 395 400

Gly Gly Ile Val Ala Gly Cys Leu Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val  
 405 410 415

Glu His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Phe Ile  
 420 425 430

Ala Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Lys Lys His Gly Val Arg Tyr Ala  
 435 440 445

Tyr Tyr Pro Tyr Ile Trp Gln Asn Leu His Ser Thr Val Ser Tyr Met  
 450 455 460

His Gly Thr Gly Thr Gly Ala Arg Trp Glu Leu Gln Pro Leu Ser Gly  
 465 470 475 480

Arg Ala

<210> 103

<211> 1512

<212> DNA

172

&lt;213&gt; Thalassiosira pseudonana

&lt;400&gt; 102

Met Pro Pro Asn Ala Glu Val Lys Asn Leu Arg Ser Arg Ser Ile Pro  
 1 5 10 15

Thr Lys Lys Ser Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ala Asn Asp Asp Pro Ala  
 20 25 30

Thr Gln Ser Thr Ser Pro Val Asn Arg Thr Leu Lys Ser Leu Asn Gly  
 35 40 45

Asn Glu Ile Ala Ile Asp Gly Val Ile Tyr Asp Ile Asp Gly Phe Val  
 50 55 60

His Pro Gly Gly Glu Val Ile Ser Phe Phe Gly Gly Asn Asp Val Thr  
 65 70 75 80

Val Gln Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His Asn Ser Lys His Leu Glu  
 85 90 95

Lys Met Arg Ala Val Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Ser Thr Glu Tyr Lys  
 100 105 110

Phe Asp Thr Pro Phe Glu Arg Glu Ile Lys Ser Glu Val Phe Lys Ile  
 115 120 125

Val Arg Arg Gly Arg Glu Phe Gly Thr Thr Gly Tyr Phe Leu Arg Ala  
 130 135 140

Phe Phe Tyr Ile Ala Leu Phe Phe Thr Met Gln Tyr Thr Phe Ala Thr  
 145 150 155 160

Cys Thr Thr Phe Thr Thr Tyr Asp His Trp Tyr Gln Ser Gly Val Phe  
 165 170 175

Ile Ala Ile Val Phe Gly Ile Ser Gln Ala Phe Ile Gly Leu Asn Val  
 180 185 190

Gln His Asp Ala Asn His Gly Ala Ala Ser Lys Arg Pro Trp Val Asn  
 195 200 205

Asp Leu Leu Gly Ser Gly Ala Asp Leu Ile Gly Gly Cys Lys Trp Asn  
 210 215 220

Trp Leu Ala Gln His Trp Thr His His Ala Tyr Thr Asn His Ala Asp  
 225 230 235 240

Lys Asp Pro Asp Ser Phe Ser Ser Glu Pro Val Phe Asn Phe Asn Asp  
 245 250 255

171

tat ccc att ggt cac ccc aaa aga aag tgg tgg cat agg ttc caa ggg Tyr Pro Ile Gly His Pro Lys Arg Lys Trp Trp His Arg Phe Gln Gly 260 265 270	816
ctc tac ttc cta atc atg ctg agt ttc tat tgg gta tcg atg gta ttc Leu Tyr Phe Leu Ile Met Leu Ser Phe Tyr Trp Val Ser Met Val Phe 275 280 285	864
aac cca caa gtt atc gac ctc cgt cat gct gga gct gcc tac gtt gga Asn Pro Gln Val Ile Asp Leu Arg His Ala Gly Ala Ala Tyr Val Gly 290 295 300	912
ttt cag atg gag aac gac ttt atc gtc aaa cgg aga aag tat gca atg Phe Gln Met Glu Asn Asp Phe Ile Val Lys Arg Arg Lys Tyr Ala Met 305 310 315 320	960
gca ctt cgt gca atg tac ttc tat ttc aac atc tat tgt ccg att gtc Ala Leu Arg Ala Met Tyr Phe Tyr Phe Asn Ile Tyr Cys Pro Ile Val 325 330 335	1008
aac aat gga ttg act tgg tcg aca gtt gga atc atc ctc tta atg gga Asn Asn Gly Leu Thr Trp Ser Thr Val Gly Ile Ile Leu Leu Met Gly 340 345 350	1056
gtt agc gaa agc ttc atg ctc tcc ggt cta ttc gta ctc tca cac aac Val Ser Glu Ser Phe Met Leu Ser Gly Leu Phe Val Leu Ser His Asn 355 360 365	1104
ttt gaa aat tcc gaa cgt gat cct acc tct gag tat cgc aag act ggt Phe Glu Asn Ser Glu Arg Asp Pro Thr Ser Glu Tyr Arg Lys Thr Gly 370 375 380	1152
gag caa gta tgt tgg ttc aag tct caa gtg gag act tct tct acc tac Glu Gln Val Cys Trp Phe Lys Ser Gln Val Glu Thr Ser Ser Thr Tyr 385 390 395 400	1200
gga ggt atc gtt gct ggg tgt ctc act ggt gga ctc aac ttt caa gtg Gly Gly Ile Val Ala Gly Cys Leu Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val 405 410 415	1248
gag cat cat ttg ttc ccg agg atg agc agt gct tgg tat cct ttc atc Glu His His Leu Phe Pro Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Phe Ile 420 425 430	1296
gcg ccg aag gtt aga gag att tgt aag aag cat gga gtt aga tac gct Ala Pro Lys Val Arg Glu Ile Cys Lys Lys His Gly Val Arg Tyr Ala 435 440 445	1344
tac tat ccg tac atc tgg cag aac ttg cat tct acc gtg agt tac atg Tyr Tyr Pro Tyr Ile Trp Gln Asn Leu His Ser Thr Val Ser Tyr Met 450 455 460	1392
cat ggg acg gga acg gga gct aga tgg gag ctt cag ccg ttg tct gga His Gly Thr Gly Thr Gly Ala Arg Trp Glu Leu Gln Pro Leu Ser Gly 465 470 475 480	1440
agg gcg tag Arg Ala	1449

&lt;210&gt; 102

&lt;211&gt; 482

&lt;212&gt; PRT

170

&lt;223&gt; Delta-5-Desaturase

&lt;400&gt; 101

atg cca ccc aac gcc gag gtc aaa aac ctc cgt tca cgt tcc atc cca	48
Met Pro Pro Asn Ala Glu Val Lys Asn Leu Arg Ser Arg Ser Ile Pro	
1 5 10 15	
acg aag aag tcc agt tca tcg tca tcc acc gcg aac gac gat ccg gct	96
Thr Lys Lys Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ala Asn Asp Asp Pro Ala	
20 25 30	
acc caa tcc acc tca cct gtg aac cga acc ctc aag tct ttg aat gga	144
Thr Gln Ser Thr Ser Pro Val Asn Arg Thr Leu Lys Ser Leu Asn Gly	
35 40 45	
aac gaa ata gct att gac ggt gtc atc tat gat att gat ggc ttt gtc	192
Asn Glu Ile Ala Ile Asp Gly Val Ile Tyr Asp Ile Asp Gly Phe Val	
50 55 60	
cat cct gga gga gag gtt att agc ttc ttt gga ggc aac gat gtg act	240
His Pro Gly Gly Glu Val Ile Ser Phe Phe Gly Gly Asn Asp Val Thr	
65 70 75 80	
gta cag tac aaa atg att cat ccg tat cat aat agt aag cat ctc gag	288
Val Gln Tyr Lys Met Ile His Pro Tyr His Asn Ser Lys His Leu Glu	
85 90 95	
aag atg aga gcc gtt gga aag att gca gac tac tcc aca gag tac aag	336
Lys Met Arg Ala Val Gly Lys Ile Ala Asp Tyr Ser Thr Glu Tyr Lys	
100 105 110	
ttc gac aca ccc ttt gaa cga gag atc aaa tcc gaa gtg ttc aaa atc	384
Phe Asp Thr Pro Phe Glu Arg Glu Ile Lys Ser Glu Val Phe Lys Ile	
115 120 125	
gtc cgt cga gga cgt gaa ttc ggt aca aca gga tat ttc ctc cgt gcc	432
Val Arg Arg Gly Arg Glu Phe Gly Thr Thr Gly Tyr Phe Leu Arg Ala	
130 135 140	
ttc ttc tac att gct ctc ttc ttc acc atg caa tac acc ttc gcc aca	480
Phe Phe Tyr Ile Ala Leu Phe Phe Thr Met Gln Tyr Thr Phe Ala Thr	
145 150 155 160	
tgc act acc ttc acc acc tac gat cat tgg tat caa agt ggt gta ttc	528
Cys Thr Thr Phe Thr Thr Tyr Asp His Trp Tyr Gln Ser Gly Val Phe	
165 170 175	
atc gcc att gtg ttt ggt atc tca caa gct ttc att ggg ttg aat gta	576
Ile Ala Ile Val Phe Gly Ile Ser Gln Ala Phe Ile Gly Leu Asn Val	
180 185 190	
caa cat gat gcc aat cac gga gct gct agc aaa cga cct tgg gtg aat	624
Gln His Asp Ala Asn His Gly Ala Ala Ser Lys Arg Pro Trp Val Asn	
195 200 205	
gat ctc ctt gga tct gga gct gat ctc atc ggt gga tgc aaa tgg aac	672
Asp Leu Leu Gly Ser Gly Ala Asp Leu Ile Gly Gly Cys Lys Trp Asn	
210 215 220	
tgg ttg gct cag cat tgg act cat cat gcg tat acc aat cac gct gat	720
Trp Leu Ala Gln His Trp Thr His His Ala Tyr Thr Asn His Ala Asp	
225 230 235 240	
aaa gat cct gat agc ttt agt tcc gag ccg gtc ttc aac ttt aac gat	768
Lys Asp Pro Asp Ser Phe Ser Ser Glu Pro Val Phe Asn Phe Asn Asp	
245 250 255	

## 169

Leu Gly Leu Tyr Trp Leu Ser Thr Val Phe Asn Pro Gln Phe Ile Asp  
 275 280 285  
 Leu Arg Gln Arg Gly Ala Gln Tyr Val Gly Ile Gln Met Glu Asn Asp  
 290 295 300  
 Phe Ile Val Lys Arg Arg Lys Tyr Ala Val Ala Leu Arg Met Met Tyr  
 305 310 315 320  
 Ile Tyr Leu Asn Ile Val Ser Pro Phe Met Asn Asn Gly Leu Ser Trp  
 325 330 335  
 Ser Thr Phe Gly Ile Ile Met Leu Met Gly Ile Ser Glu Ser Leu Thr  
 340 345 350  
 Leu Ser Val Leu Phe Ser Leu Ser His Asn Phe Ile Asn Ser Asp Arg  
 355 360 365  
 Asp Pro Thr Ala Asp Phe Lys Lys Thr Gly Glu Gln Val Cys Trp Phe  
 370 375 380  
 Lys Ser Gln Val Glu Thr Ser Ser Thr Tyr Gly Gly Phe Ile Ser Gly  
 385 390 395 400  
 Cys Leu Thr Gly Gly Leu Asn Phe Gln Val Glu His His Leu Phe Pro  
 405 410 415  
 Arg Met Ser Ser Ala Trp Tyr Pro Tyr Ile Ala Pro Thr Val Arg Glu  
 420 425 430  
 Val Cys Lys Lys His Gly Val Asn Tyr Ala Tyr Tyr Pro Trp Ile Gly  
 435 440 445  
 Gln Asn Leu Val Ser Thr Phe Lys Tyr Met His Arg Ala Gly Ser Gly  
 450 455 460  
 Ala Asn Trp Glu Leu Lys Pro Leu Ser Gly Ser Ala  
 465 470 475

&lt;210&gt; 101

&lt;211&gt; 1449

&lt;212&gt; DNA

<213> *Thalassiosira pseudonana*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1449)

168

Met Pro Pro Asn Ala Asp Ile Ser Arg Ile Arg Asn Arg Ile Pro Thr  
 1 5 10 15  
 Lys Thr Gly Thr Val Ala Ser Ala Asp Asn Asn Asp Pro Ala Thr Gln  
 20 25 30  
 Ser Val Arg Thr Leu Lys Ser Leu Lys Gly Asn Glu Val Val Ile Asn  
 35 40 45  
 Gly Thr Ile Tyr Asp Ile Ala Asp Phe Val His Pro Gly Gly Glu Val  
 50 55 60  
 Val Lys Phe Phe Gly Gly Asn Asp Val Thr Ile Gln Tyr Asn Met Ile  
 65 70 75 80  
 His Pro Tyr His Thr Gly Lys His Leu Glu Lys Met Lys Ala Val Gly  
 85 90 95  
 Lys Val Val Asp Trp Gln Ser Asp Tyr Lys Phe Asp Thr Pro Phe Glu  
 100 105 110  
 Arg Glu Ile Lys Ser Glu Val Phe Lys Ile Val Arg Arg Gly Arg Glu  
 115 120 125  
 Phe Gly Thr Thr Gly Tyr Phe Leu Arg Ala Phe Phe Tyr Ile Ala Leu  
 130 135 140  
 Phe Phe Thr Met Gln Tyr Thr Phe Ala Thr Cys Thr Thr Phe Thr Thr  
 145 150 155 160  
 Tyr Asp His Trp Tyr Gln Ser Gly Val Phe Ile Ala Ile Val Phe Gly  
 165 170 175  
 Ile Ser Gln Ala Phe Ile Gly Leu Asn Val Gln His Asp Ala Asn His  
 180 185 190  
 Gly Ala Ala Ser Lys Arg Pro Trp Val Asn Asp Leu Leu Gly Phe Gly  
 195 200 205  
 Thr Asp Leu Ile Gly Ser Asn Lys Trp Asn Trp Met Ala Gln His Trp  
 210 215 220  
 Thr His His Ala Tyr Thr Asn His Ser Glu Lys Asp Pro Asp Ser Phe  
 225 230 235 240  
 Ser Ser Glu Pro Met Phe Ala Phe Asn Asp Tyr Pro Ile Gly His Pro  
 245 250 255  
 Lys Arg Lys Trp Trp His Arg Phe Gln Gly Gly Tyr Phe Leu Phe Met  
 260 265 270



## 167

Lys	Arg	Lys	Trp	Trp	His	Arg	Phe	Gln	Gly	Gly	Tyr	Phe	Leu	Phe	Met		
			260					265					270				
ctt	gga	ctt	tac	tgg	ctc	tcg	act	gta	ttc	aat	ccg	caa	ttc	att	gat	864	
Leu	Gly	Leu	Tyr	Trp	Leu	Ser	Thr	Val	Phe	Asn	Pro	Gln	Phe	Ile	Asp		
		275				280						285					
ctt	cgt	caa	cgt	ggg	gct	cag	tac	gtc	gga	att	caa	atg	gag	aat	gat	912	
Leu	Arg	Gln	Arg	Gly	Ala	Gln	Tyr	Val	Gly	Ile	Gln	Met	Glu	Asn	Asp		
	290					295					300						
ttc	att	gtc	aag	agg	agg	aag	tac	gcc	gtt	gca	ttg	agg	atg	atg	tac	960	
Phe	Ile	Val	Lys	Arg	Arg	Lys	Tyr	Ala	Val	Ala	Leu	Arg	Met	Met	Tyr		
305					310					315					320		
att	tac	ttg	aac	att	gtc	agc	ccc	ttc	atg	aac	aat	ggt	ttg	agc	tgg	1008	
Ile	Tyr	Leu	Asn	Ile	Val	Ser	Pro	Phe	Met	Asn	Asn	Gly	Leu	Ser	Trp		
			325						330					335			
tct	acc	ttt	gga	atc	atc	atg	ttg	atg	gga	atc	agc	gag	agt	ctc	act	1056	
Ser	Thr	Phe	Gly	Ile	Ile	Met	Leu	Met	Gly	Ile	Ser	Glu	Ser	Leu	Thr		
		340						345					350				
ctc	agt	gtg	ctc	ttc	tcg	ttg	tct	cac	aac	ttc	atc	aat	tcg	gat	cgt	1104	
Leu	Ser	Val	Leu	Phe	Ser	Leu	Ser	His	Asn	Phe	Ile	Asn	Ser	Asp	Arg		
		355					360					365					
gat	cct	acg	gct	gac	ttc	aaa	aag	acc	gga	gaa	caa	gtg	tgc	tgg	ttc	1152	
Asp	Pro	Thr	Ala	Asp	Phe	Lys	Lys	Thr	Gly	Glu	Gln	Val	Cys	Trp	Phe		
	370					375					380						
aag	tcg	cag	gtg	gag	act	tcg	tct	acc	tat	ggg	ggt	ttt	att	tcc	gga	1200	
Lys	Ser	Gln	Val	Glu	Thr	Ser	Ser	Thr	Tyr	Gly	Gly	Phe	Ile	Ser	Gly		
	385				390					395					400		
tgt	ctt	acg	gga	gga	ctc	aac	ttt	cag	gtg	gaa	cat	cat	ctc	ttt	ccc	1248	
Cys	Leu	Thr	Gly	Gly	Leu	Asn	Phe	Gln	Val	Glu	His	His	Leu	Phe	Pro		
			405						410					415			
cgt	atg	agc	agt	gct	tgg	tat	cct	tac	att	gca	cct	acg	gtt	cgt	gag	1296	
Arg	Met	Ser	Ser	Ala	Trp	Tyr	Pro	Tyr	Ile	Ala	Pro	Thr	Val	Arg	Glu		
			420					425					430				
gtt	tgc	aag	aag	cac	ggg	gtg	aac	tac	gct	tat	tat	cct	tgg	att	ggg	1344	
Val	Cys	Lys	Lys	His	Gly	Val	Asn	Tyr	Ala	Tyr	Tyr	Pro	Trp	Ile	Gly		
		435					440					445					
cag	aat	ttg	gta	tca	aca	ttc	aaa	tac	atg	cat	cgc	gct	ggt	agt	gga	1392	
Gln	Asn	Leu	Val	Ser	Thr	Phe	Lys	Tyr	Met	His	Arg	Ala	Gly	Ser	Gly		
	450					455					460						
gcc	aac	tgg	gag	ctc	aag	ccg	ttg	tct	gga	agt	gcc	taa				1431	
Ala	Asn	Trp	Glu	Leu	Lys	Pro	Leu	Ser	Gly	Ser	Ala						
	465				470					475							

&lt;210&gt; 100

&lt;211&gt; 476

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Thalassiosira pseudonana

&lt;400&gt; 100

<400> 99  
 atg ccc ccc aac gcc gat atc tcc cgc atc cgc aac cgc atc ccc acc 48  
 Met Pro Pro Asn Ala Asp Ile Ser Arg Ile Arg Asn Arg Ile Pro Thr  
 1 5 10 15  
 aaa aca ggt acc gtt gcc tct gcc gac aac aac gac ccc gcc acc caa 96  
 Lys Thr Gly Thr Val Ala Ser Ala Asp Asn Asn Asp Pro Ala Thr Gln  
 20 25 30  
 tcc gtc cga acc ctc aaa tct ctc aag ggc aac gag gtc gtc atc aac 144  
 Ser Val Arg Thr Leu Lys Ser Leu Lys Gly Asn Glu Val Val Ile Asn  
 35 40 45  
 ggc aca att tat gac att gct gac ttt gtc cat cct gga gga gag gtt 192  
 Gly Thr Ile Tyr Asp Ile Ala Asp Phe Val His Pro Gly Gly Glu Val  
 50 55 60  
 gtc aag ttc ttt ggt ggg aat gat gtt act att cag tat aat atg att 240  
 Val Lys Phe Phe Gly Gly Asn Asp Val Thr Ile Gln Tyr Asn Met Ile  
 65 70 75 80  
 cat cgc tat cat acg ggg aaa cat ctg gag aag atg aag gct gtt gga 288  
 His Pro Tyr His Thr Gly Lys His Leu Glu Lys Met Lys Ala Val Gly  
 85 90 95  
 aag gtt gta gat tgg cag tgc gac tac aag ttc gac acc ccc ttt gaa 336  
 Lys Val Val Asp Trp Gln Ser Asp Tyr Lys Phe Asp Thr Pro Phe Glu  
 100 105 110  
 cga gag atc aaa tca gaa gtg ttc aag atc gta cgt cgc ggg cgt gag 384  
 Arg Glu Ile Lys Ser Glu Val Phe Lys Ile Val Arg Arg Gly Arg Glu  
 115 120 125  
 ttc ggc aca aca ggc tac ttc ctc cgt gcc ttt ttc tac atc gct ctc 432  
 Phe Gly Thr Thr Gly Tyr Phe Leu Arg Ala Phe Phe Tyr Ile Ala Leu  
 130 135 140  
 ttc ttc acc atg caa tac act ttc gcc aca tgc acc acc ttc acc acc 480  
 Phe Phe Thr Met Gln Tyr Thr Phe Ala Thr Cys Thr Thr Phe Thr Thr  
 145 150 155 160  
 tac gat cac tgg tat cag agt ggt gta ttc atc gca att gtg ttt ggt 528  
 Tyr Asp His Trp Tyr Gln Ser Gly Val Phe Ile Ala Ile Val Phe Gly  
 165 170 175  
 att tca cag gca ttc att ggg ttg aat gtc cag cac gat gcc aat cac 576  
 Ile Ser Gln Ala Phe Ile Gly Leu Asn Val Gln His Asp Ala Asn His  
 180 185 190  
 gga gct gcc agt aag cgt ccc tgg gtg aat gac ttg ttg gga ttt gga 624  
 Gly Ala Ala Ser Lys Arg Pro Trp Val Asn Asp Leu Leu Gly Phe Gly  
 195 200 205  
 acg gat ttg att gga tct aac aaa tgg aat tgg atg gca cag cat tgg 672  
 Thr Asp Leu Ile Gly Ser Asn Lys Trp Asn Trp Met Ala Gln His Trp  
 210 215 220  
 act cat cac gct tac act aac cat agt gag aag gat ccc gat agc ttc 720  
 Thr His His Ala Tyr Thr Asn His Ser Glu Lys Asp Pro Asp Ser Phe  
 225 230 235 240  
 agc tgc gaa cct atg ttt gca ttc aat gac tat ccc att gga cac ccg 768  
 Ser Ser Glu Pro Met Phe Ala Phe Asn Asp Tyr Pro Ile Gly His Pro  
 245 250 255  
 aag aga aag tgg tgg cat agg ttc cag gga ggg tac ttc ctc ttc atg 816

165

Ser Glu Asn Ala Lys Leu Glu Leu Glu Lys Arg Gly Leu Gln Tyr Pro  
 305 310 315 320

Leu Leu Glu Lys Leu Gly Ile Thr Leu His Tyr Thr Trp Met Phe Val  
 325 330 335

Leu Ser Ser Gly Phe Gly Arg Trp Ser Leu Pro Tyr Ser Ile Met Tyr  
 340 345 350

Phe Phe Thr Ala Thr Cys Ser Ser Gly Leu Phe Leu Ala Leu Val Phe  
 355 360 365

Gly Leu Gly His Asn Gly Met Ser Val Tyr Asp Ala Thr Thr Arg Pro  
 370 375 380

Asp Phe Trp Gln Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Ile Ile Gly Gly  
 385 390 395 400

His Gly Ile Pro Gln Phe Phe Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln  
 405 410 415

Tyr Gln Val Asp His His Leu Phe Pro Met Met Pro Arg Asn Asn Ile  
 420 425 430

Ala Lys Cys His Lys Leu Val Glu Ser Phe Cys Lys Glu Trp Gly Val  
 435 440 445

Lys Tyr His Glu Ala Asp Met Trp Asp Gly Thr Val Glu Val Leu Gln  
 450 455 460

His Leu Ser Lys Val Ser Asp Asp Phe Leu Val Glu Met Val Lys Asp  
 465 470 475 480

Phe Pro Ala Met

<210> 99

<211> 1431

<212> DNA

<213> *Thalassiosira pseudonana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1431)

<223> Delta-5-Desaturase

Lys His Ile Thr Pro Asp Asp Ala Trp Val Val His Gln Asn Lys Val  
 35 40 45  
 Tyr Asp Val Ser Asn Trp Tyr Asp His Pro Gly Gly Ala Val Val Phe  
 50 55 60  
 Thr His Ala Gly Asp Asp Met Thr Asp Ile Phe Ala Ala Phe His Ala  
 65 70 75 80  
 Gln Gly Ser Gln Ala Met Met Lys Lys Phe Tyr Ile Gly Asp Leu Ile  
 85 90 95  
 Pro Glu Ser Val Glu His Lys Asp Gln Arg Gln Leu Asp Phe Glu Lys  
 100 105 110  
 Gly Tyr Arg Asp Leu Arg Ala Lys Leu Val Met Met Gly Met Phe Lys  
 115 120 125  
 Ser Ser Lys Met Tyr Tyr Ala Tyr Lys Cys Ser Phe Asn Met Cys Met  
 130 135 140  
 Trp Leu Val Ala Val Ala Met Val Tyr Tyr Ser Asp Ser Leu Ala Met  
 145 150 155 160  
 His Ile Gly Ser Ala Leu Leu Leu Gly Leu Phe Trp Gln Gln Cys Gly  
 165 170 175  
 Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His His Gln Val Phe Lys Gln Arg Lys  
 180 185 190  
 Tyr Gly Asp Leu Val Gly Ile Phe Trp Gly Asp Leu Met Gln Gly Phe  
 195 200 205  
 Ser Met Gln Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Gly His His Ala Val Pro  
 210 215 220  
 Asn Leu His Asn Ser Ser Leu Asp Ser Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile  
 225 230 235 240  
 Asp Thr Met Pro Leu Leu Ala Trp Ser Leu Lys Gln Ala Gln Ser Phe  
 245 250 255  
 Arg Glu Ile Asn Lys Gly Lys Asp Ser Thr Phe Val Lys Tyr Ala Ile  
 260 265 270  
 Lys Phe Gln Ala Phe Thr Tyr Phe Pro Ile Leu Leu Leu Ala Arg Ile  
 275 280 285  
 Ser Trp Leu Asn Glu Ser Phe Lys Thr Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala  
 290 295 300

## 163

tcg gag aat gcc aag ttg gag ttg gag aag cgt gga ctt cag tac cca 960  
 Ser Glu Asn Ala Lys Leu Glu Leu Glu Lys Arg Gly Leu Gln Tyr Pro  
 305 310 315 320  
 ctt ttg gag aag ctt gga atc acc ctt cat tac act tgg atg ttc gtc 1008  
 Leu Leu Glu Lys Leu Gly Ile Thr Leu His Tyr Thr Trp Met Phe Val  
 325 330 335  
 ctc tct tcc gga ttt gga agg tgg tct ctt cca tat tcc atc atg tat 1056  
 Leu Ser Ser Gly Phe Gly Arg Trp Ser Leu Pro Tyr Ser Ile Met Tyr  
 340 345 350  
 ttc ttc act gcc aca tgc tcc tgc gga ctt ttc ctc gca ttg gtc ttt 1104  
 Phe Phe Thr Ala Thr Cys Ser Ser Gly Leu Phe Leu Ala Leu Val Phe  
 355 360 365  
 gga ttg gga cac aac ggt atg tca gtg tac gat gcc acc acc cga cct 1152  
 Gly Leu Gly His Asn Gly Met Ser Val Tyr Asp Ala Thr Thr Arg Pro  
 370 375 380  
 gac ttc tgg caa ctc caa gtc acc act aca cgt aac atc att ggt gga 1200  
 Asp Phe Trp Gln Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Ile Ile Gly Gly  
 385 390 395 400  
 cac ggc att ccc caa ttc ttt gtg gat tgg ttc tgc ggt gga ttg caa 1248  
 His Gly Ile Pro Gln Phe Phe Val Asp Trp Phe Cys Gly Gly Leu Gln  
 405 410 415  
 tac caa gtg gat cac cac ctc ttc ccc atg atg cct aga aac aat atc 1296  
 Tyr Gln Val Asp His His Leu Phe Pro Met Met Pro Arg Asn Asn Ile  
 420 425 430  
 gcg aaa tgc cac aag ctt gtg gag tca ttc tgt aag gag tgg ggt gtg 1344  
 Ala Lys Cys His Lys Leu Val Glu Ser Phe Cys Lys Glu Trp Gly Val  
 435 440 445  
 aag tac cat gag gcc gat atg tgg gat ggt acc gtg gaa gtg ttg caa 1392  
 Lys Tyr His Glu Ala Asp Met Trp Asp Gly Thr Val Glu Val Leu Gln  
 450 455 460  
 cat ctc tcc aag gtg tgc gat gat ttc ctt gtg gag atg gtg aag gat 1440  
 His Leu Ser Lys Val Ser Asp Asp Phe Leu Val Glu Met Val Lys Asp  
 465 470 475 480  
 ttc cct gcc atg taa 1455  
 Phe Pro Ala Met

&lt;210&gt; 98

&lt;211&gt; 484

&lt;212&gt; PRT

<213> *Thalassiosira pseudonana*

&lt;400&gt; 98

Met Gly Lys Gly Gly Asp Ala Ala Ala Ala Thr Lys Arg Ser Gly Ala  
 1 5 10 15

Leu Lys Leu Ala Glu Lys Pro Gln Lys Tyr Thr Trp Gln Glu Val Lys  
 20 25 30

## 162

aag cac atc acc ccc gac gat gcc tgg gta gtc cac caa aac aaa gtc Lys His Ile Thr Pro Asp Asp Ala Trp Val Val His Gln Asn Lys Val 35 40 45	144
tac gac gtc tcc aac tgg tac gac cac ccc ggt gga gcc gtg gtg ttc Tyr Asp Val Ser Asn Trp Tyr Asp His Pro Gly Gly Ala Val Val Phe 50 55 60	192
acc cac gcc gga gac gac atg acg gac atc ttc gcc gcc ttc cac gcc Thr His Ala Gly Asp Asp Met Thr Asp Ile Phe Ala Ala Phe His Ala 65 70 75 80	240
caa ggc tct cag gcc atg atg aag aag ttt tac att gga gat ttg att Gln Gly Ser Gln Ala Met Met Lys Lys Phe Tyr Ile Gly Asp Leu Ile 85 90 95	288
ccg gag agt gtg gag cat aag gat caa aga cag ttg gat ttc gag aag Pro Glu Ser Val Glu His Lys Asp Gln Arg Gln Leu Asp Phe Glu Lys 100 105 110	336
gga tat cgt gat tta cgg gcc aag ctt gtc atg atg ggg atg ttc aag Gly Tyr Arg Asp Leu Arg Ala Lys Leu Val Met Met Gly Met Phe Lys 115 120 125	384
tcg agt aag atg tat tat gca tac aag tgc tcg ttc aat atg tgc atg Ser Ser Lys Met Tyr Tyr Ala Tyr Lys Cys Ser Phe Asn Met Cys Met 130 135 140	432
tgg ttg gtg gcg gtg gcc atg gtg tac tac tcg gac agt ttg gca atg Trp Leu Val Ala Val Ala Met Val Tyr Tyr Ser Asp Ser Leu Ala Met 145 150 155 160	480
cac att gga tcg gct ctc ttg ttg gga ttg ttc tgg cag cag tgt gga His Ile Gly Ser Ala Leu Leu Leu Gly Leu Phe Trp Gln Gln Cys Gly 165 170 175	528
tgg ctt gcg cac gac ttt ctt cac cac caa gtc ttt aag caa cga aag Trp Leu Ala His Asp Phe Leu His His Gln Val Phe Lys Gln Arg Lys 180 185 190	576
tac gga gat ctc gtt ggc atc ttt tgg gga gat ctc atg cag ggg ttc Tyr Gly Asp Leu Val Gly Ile Phe Trp Gly Asp Leu Met Gln Gly Phe 195 200 205	624
tcg atg cag tgg tgg aag aac aag cac aat ggc cac cat gct gtt ccc Ser Met Gln Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Gly His His Ala Val Pro 210 215 220	672
aac ttg cac aac tct tcc ttg gac agt cag gat ggt gat ccc gat att Asn Leu His Asn Ser Ser Leu Asp Ser Gln Asp Gly Asp Pro Asp Ile 225 230 235 240	720
gat acc atg cca ctc ctt gct tgg agt ctc aag cag gct cag agt ttc Asp Thr Met Pro Leu Leu Ala Trp Ser Leu Lys Gln Ala Gln Ser Phe 245 250 255	768
aga gag atc aat aag gga aag gac agt acc ttc gtc aag tac gct atc Arg Glu Ile Asn Lys Gly Lys Asp Ser Thr Phe Val Lys Tyr Ala Ile 260 265 270	816
aaa ttc cag gca ttc aca tac ttc ccc atc ctc ctc ttg gct cgc atc Lys Phe Gln Ala Phe Thr Tyr Phe Pro Ile Leu Leu Leu Ala Arg Ile 275 280 285	864
tct tgg ttg aat gaa tcc ttc aaa act gca ttc gga ctc gga gct gcc Ser Trp Leu Asn Glu Ser Phe Lys Thr Ala Phe Gly Leu Gly Ala Ala 290 295 300	912

## 161

Asn His Ala Val Ser Ser Val Leu Leu Gly Ile Val Gly Phe Met Ala  
 385 390 395 400

Cys Gln Gly Ile Val Leu Ala Cys Thr Phe Ala Val Ser His Asn Val  
 405 410 415

Ala Glu Ala Lys Ile Pro Glu Asp Thr Gly Gly Glu Ala Trp Glu Arg  
 420 425 430

Asp Trp Gly Val Gln Gln Leu Val Thr Ser Ala Asp Trp Gly Gly Lys  
 435 440 445

Ile Gly Asn Phe Phe Thr Gly Gly Leu Asn Leu Gln Val Glu His His  
 450 455 460

Leu Phe Pro Ala Ile Cys Phe Val His Tyr Pro Asp Ile Ala Lys Ile  
 465 470 475 480

Val Lys Glu Glu Ala Ala Lys Leu Asn Ile Pro Tyr Ala Ser Tyr Arg  
 485 490 495

Thr Leu Pro Gly Ile Phe Val Gln Phe Trp Arg Phe Met Lys Asp Met  
 500 505 510

Gly Thr Ala Glu Gln Ile Gly Glu Val Pro Leu Pro Lys Ile Pro Asn  
 515 520 525

Pro Gln Leu Ala Pro Lys Leu Ala  
 530 535

<210> 97

<211> 1455

<212> DNA

<213> *Thalassiosira pseudonana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1455)

<223> Delta-6-Desaturase

<400> 97

atg gga aaa gga gga gac gca gcc gca gct acc aag cgt agt gga gca 48  
 Met Gly Lys Gly Gly Asp Ala Ala Ala Thr Lys Arg Ser Gly Ala  
 1 5 10 15

ttg aaa ttg gcg gag aag ccg cag aag tac act tgg cag gag gtg aag 96  
 Leu Lys Leu Ala Glu Lys Pro Gln Lys Tyr Thr Trp Gln Glu Val Lys  
 20 25 30

## 160

Tyr Asp Leu Asp Pro Phe Phe Ala Arg His Pro Gly Gly Asp Trp Leu  
 115 120 125

Leu Asn Leu Ala Val Gly Arg Asp Cys Thr Ala Leu Ile Glu Ser Tyr  
 130 135 140

His Leu Arg Pro Glu Val Ala Thr Ala Arg Phe Arg Met Leu Pro Lys  
 145 150 155 160

Leu Glu Asp Phe Pro Val Glu Ala Val Pro Lys Ser Pro Arg Pro Asn  
 165 170 175

Asp Ser Pro Leu Tyr Asn Asn Ile Arg Asn Arg Val Arg Glu Glu Leu  
 180 185 190

Phe Pro Glu Glu Gly Lys Asn Met His Arg Gln Gly Gly Asp His Gly  
 195 200 205

Asp Gly Asp Asp Ser Gly Phe Arg Arg Leu Leu Leu Met Pro Cys Thr  
 210 215 220

Tyr Ser Leu Pro Gly Val Pro Phe Arg Leu Pro Pro Arg Val Ser Arg  
 225 230 235 240

Gly Arg Gly Leu Val Ser Arg Phe Arg His Cys Ala Asn His Gly Ala  
 245 250 255

Met Ser Pro Ser Pro Ala Val Asn Gly Val Leu Gly Leu Thr Asn Asp  
 260 265 270

Leu Ile Gly Gly Ser Ser Leu Met Trp Arg Tyr His His Gln Val Ser  
 275 280 285

His His Ile His Cys Asn Asp Asn Ala Met Asp Gln Asp Val Tyr Thr  
 290 295 300

Ala Met Pro Leu Leu Arg Phe Asp Ala Arg Arg Pro Lys Ser Trp Tyr  
 305 310 315 320

His Arg Phe Gln Gln Trp Tyr Met Phe Leu Ala Phe Pro Leu Leu Gln  
 325 330 335

Val Ala Phe Gln Val Gly Asp Ile Ala Ala Leu Phe Thr Arg Asp Thr  
 340 345 350

Glu Gly Ala Lys Leu His Gly Ala Thr Thr Trp Glu Leu Thr Thr Val  
 355 360 365

Val Leu Gly Lys Ile Val His Phe Gly Leu Leu Leu Gly Pro Leu Met  
 370 375 380



## 159

Asp Trp Gly Val Gln Gln Leu Val Thr Ser Ala Asp Trp Gly Gly Lys  
 435 440 445  
 ata ggt aac ttc ttc acg ggt ggc ctc aac ttg caa gtt gag cac cac 1392  
 Ile Gly Asn Phe Phe Thr Gly Gly Leu Asn Leu Gln Val Glu His His  
 450 455 460  
 ttg ttt ccg gcg att tgc ttc gtc cac tac ccg gac atc gcg aag atc 1440  
 Leu Phe Pro Ala Ile Cys Phe Val His Tyr Pro Asp Ile Ala Lys Ile  
 465 470 475 480  
 gtg aag gaa gaa gcg gcc aag ctc aac atc cct tac gcg tct tac agg 1488  
 Val Lys Glu Glu Ala Ala Lys Leu Asn Ile Pro Tyr Ala Ser Tyr Arg  
 485 490 495  
 act ctt cct ggt att ttc gtc caa ttc tgg aga ttt atg aag gac atg 1536  
 Thr Leu Pro Gly Ile Phe Val Gln Phe Trp Arg Phe Met Lys Asp Met  
 500 505 510  
 ggc acg gct gag caa att ggt gaa gtt cca ttg ccg aag att ccc aac 1584  
 Gly Thr Ala Glu Gln Ile Gly Val Pro Leu Pro Lys Ile Pro Asn  
 515 520 525  
 ccg cag ctc gcg ccg aag ctc gct tag 1611  
 Pro Gln Leu Ala Pro Lys Leu Ala  
 530 535

&lt;210&gt; 96

&lt;211&gt; 536

&lt;212&gt; PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

&lt;400&gt; 96

Met Tyr Leu Gly Arg Gly Arg Leu Glu Ser Gly Thr Thr Arg Gly Met  
 1 5 10 15  
 Met Arg Thr His Ala Arg Arg Pro Ser Thr Thr Ser Asn Pro Cys Ala  
 20 25 30  
 Arg Ser Arg Val Arg Lys Thr Thr Glu Arg Ser Leu Ala Arg Val Arg  
 35 40 45  
 Arg Ser Thr Ser Glu Lys Gly Ser Ala Leu Val Leu Glu Arg Glu Ser  
 50 55 60  
 Glu Arg Glu Lys Glu Glu Gly Gly Lys Ala Arg Ala Glu Gly Leu Arg  
 65 70 75 80  
 Phe Gln Arg Pro Asp Val Ala Ala Pro Gly Gly Ala Asp Pro Trp Asn  
 85 90 95  
 Asp Glu Lys Trp Thr Lys Thr Lys Trp Thr Val Phe Arg Asp Val Ala  
 100 105 110

## 158

Leu	Glu	Asp	Phe	Pro	Val	Glu	Ala	Val	Pro	Lys	Ser	Pro	Arg	Pro	Asn		
				165					170					175			
gat	tcg	ccg	tta	tac	aac	aac	att	cgc	aac	cga	gtc	cgc	gaa	gag	ctc	576	
Asp	Ser	Pro	Leu	Tyr	Asn	Asn	Ile	Arg	Asn	Arg	Val	Arg	Glu	Glu	Leu		
			180					185					190				
ttc	cca	gag	gag	gga	aag	aat	atg	cac	aga	cag	ggc	ggc	gac	cac	ggc	624	
Phe	Pro	Glu	Glu	Gly	Lys	Asn	Met	His	Arg	Gln	Gly	Gly	Asp	His	Gly		
		195					200					205					
gac	ggt	gac	gat	tct	ggg	ttt	cgc	cgc	ctt	ttg	ctt	atg	ccg	tgt	acc	672	
Asp	Gly	Asp	Asp	Ser	Gly	Phe	Arg	Arg	Leu	Leu	Leu	Met	Pro	Cys	Thr		
	210					215					220						
tat	tcc	ctt	ccg	ggg	gtt	cct	ttc	cgg	ctg	cct	cct	cgg	gtc	tcg	cgg	720	
Tyr	Ser	Leu	Pro	Gly	Val	Pro	Phe	Arg	Leu	Pro	Pro	Arg	Val	Ser	Arg		
225					230					235					240		
ggg	cgt	gga	ttg	gtc	tca	cga	ttc	agg	cac	tgc	gcc	aac	cac	ggc	gcg	768	
Gly	Arg	Gly	Leu	Val	Ser	Arg	Phe	Arg	His	Cys	Ala	Asn	His	Gly	Ala		
				245					250					255			
atg	tct	cct	tcg	ccg	gcc	gtt	aac	ggc	gtc	ctc	ggg	ttg	acg	aac	gat	816	
Met	Ser	Pro	Ser	Pro	Ala	Val	Asn	Gly	Val	Leu	Gly	Leu	Thr	Asn	Asp		
		260						265					270				
ctc	atc	ggc	ggc	tcg	tcc	ttg	atg	tgg	aga	tat	cac	cac	caa	gtc	agc	864	
Leu	Ile	Gly	Gly	Ser	Ser	Leu	Met	Trp	Arg	Tyr	His	His	Gln	Val	Ser		
		275					280						285				
cac	cac	att	cat	tgc	aac	gac	aac	gcc	atg	gat	caa	gac	gtg	tac	acg	912	
His	His	Ile	His	Cys	Asn	Asp	Asn	Ala	Met	Asp	Gln	Asp	Val	Tyr	Thr		
		290				295					300						
gcg	atg	cca	tta	ttg	cgt	ttc	gac	gct	cgc	cgg	ccc	aag	tcc	tgg	tac	960	
Ala	Met	Pro	Leu	Leu	Arg	Phe	Asp	Ala	Arg	Arg	Pro	Lys	Ser	Trp	Tyr		
305				310						315				320			
cat	cgc	ttc	cag	cag	tgg	tac	atg	ttt	tta	gcg	ttc	ccg	ttg	ttg	cag	1008	
His	Arg	Phe	Gln	Gln	Trp	Tyr	Met	Phe	Leu	Ala	Phe	Pro	Leu	Leu	Gln		
			325					330						335			
gtt	gcc	ttc	caa	gtc	gga	gac	att	gcc	gca	ctg	ttc	acg	cgt	gat	acc	1056	
Val	Ala	Phe	Gln	Val	Gly	Asp	Ile	Ala	Ala	Leu	Phe	Thr	Arg	Asp	Thr		
			340					345					350				
gaa	ggc	gct	aag	ctt	cac	ggg	gcg	acg	acg	tgg	gag	ctt	acc	acg	gtt	1104	
Glu	Gly	Ala	Lys	Leu	His	Gly	Ala	Thr	Thr	Trp	Glu	Leu	Thr	Thr	Val		
		355				360						365					
gtc	ctc	ggg	aag	att	gtg	cac	ttc	ggg	ctt	ttg	ttg	ggg	ccg	ttg	atg	1152	
Val	Leu	Gly	Lys	Ile	Val	His	Phe	Gly	Leu	Leu	Leu	Gly	Pro	Leu	Met		
		370				375						380					
aac	cac	gcg	gtg	agt	tct	gtt	ttg	ctg	ggg	atc	gtc	ggg	ttc	atg	gcg	1200	
Asn	His	Ala	Val	Ser	Ser	Val	Leu	Leu	Gly	Ile	Val	Gly	Phe	Met	Ala		
		385				390				395				400			
tgc	caa	ggg	ata	gtt	ctg	gcg	tgc	acg	ttt	gct	gtg	agt	cac	aat	gtc	1248	
Cys	Gln	Gly	Ile	Val	Leu	Ala	Cys	Thr	Phe	Ala	Val	Ser	His	Asn	Val		
			405						410					415			
gcg	gag	gcg	aag	ata	cct	gag	gac	acc	gga	gga	gaa	gcc	tgg	gag	aga	1296	
Ala	Glu	Ala	Lys	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Gly	Gly	Glu	Ala	Trp	Glu	Arg		
			420					425					430				
gat	tgg	ggg	gtc	cag	cag	ttg	gtg	act	agc	gcc	gac	tgg	ggg	gga	aag	1344	

Ser Tyr Leu His Lys Cys Gly Arg Thr Ala Lys Leu Ala  
 225 230 235

<210> 95

<211> 1611

<212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1611)

<223> Delta-4-Desaturase

<400> 95

atg tac ctc gga cgc ggc cgt ctc gag agc ggg acg acg cga ggg atg	48
Met Tyr Leu Gly Arg Gly Arg Leu Glu Ser Gly Thr Thr Arg Gly Met	
1 5 10 15	
atg cgg acg cac gcg cgg cga ccg tcg acg acg tcg aat ccg tgc gcg	96
Met Arg Thr His Ala Arg Arg Pro Ser Thr Thr Ser Asn Pro Cys Ala	
20 25 30	
cgg tca cgc gtg cgt aag acg acg gag cga tcg ctc gcg cga gtg cga	144
Arg Ser Arg Val Arg Lys Thr Thr Glu Arg Ser Leu Ala Arg Val Arg	
35 40 45	
cga tcg acg agt gag aag gga agc gcg ctc gtg ctc gag cga gag agc	192
Arg Ser Thr Ser Glu Lys Gly Ser Ala Leu Val Leu Glu Arg Glu Ser	
50 55 60	
gaa cgg gag aag gag gag gga ggg aaa gcg cga gcg gag gga ttg cga	240
Glu Arg Glu Lys Glu Glu Gly Gly Lys Ala Arg Ala Glu Gly Leu Arg	
65 70 75 80	
ttc caa cgc ccg gac gtc gcc gcg ccg ggg gga gcg gat cct tgg aac	288
Phe Gln Arg Pro Asp Val Ala Ala Pro Gly Gly Ala Asp Pro Trp Asn	
85 90 95	
gac gag aag tgg aca aag acc aag tgg acg gta ttc aga gac gtc gcg	336
Asp Glu Lys Trp Thr Lys Thr Lys Trp Thr Val Phe Arg Asp Val Ala	
100 105 110	
tac gat ctc gat cct ttc ttc gct cga cac ccc gga gga gac tgg ctc	384
Tyr Asp Leu Asp Pro Phe Phe Ala Arg His Pro Gly Gly Asp Trp Leu	
115 120 125	
ctg aac ttg gcc gtg gga cga gac tgc acc gcg ctc atc gaa tcc tat	432
Leu Asn Leu Ala Val Gly Arg Asp Cys Thr Ala Leu Ile Glu Ser Tyr	
130 135 140	
cac ttg cga cca gag gtg gcg acg gct cgt ttc aga atg ctg ccc aaa	480
His Leu Arg Pro Glu Val Ala Thr Ala Arg Phe Arg Met Leu Pro Lys	
145 150 155 160	
ctc gag gat ttt ccc gtc gag gcc gtg ccc aag tcc ccg aga ccg aac	528

&lt;210&gt; 94

&lt;211&gt; 237

&lt;212&gt; PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

&lt;400&gt; 94

Met Val Ser His His Ser Tyr Cys Asn Asp Ala Asp Leu Asp Gln Asp  
 1 5 10 15

Val Tyr Thr Ala Leu Pro Leu Leu Arg Leu Asp Pro Ser Gln Glu Leu  
 20 25 30

Lys Trp Phe His Arg Tyr Gln Ala Phe Tyr Ala Pro Leu Met Trp Pro  
 35 40 45

Phe Leu Trp Leu Ala Ala Gln Phe Gly Asp Ala Gln Asn Ile Leu Ile  
 50 55 60

Asp Arg Ala Ser Pro Gly Val Ala Tyr Lys Gly Leu Met Ala Asn Glu  
 65 70 75 80

Val Ala Leu Tyr Val Leu Gly Lys Val Leu His Phe Gly Leu Leu Leu  
 85 90 95

Gly Val Pro Ala Tyr Leu His Gly Leu Ser Asn Ala Ile Val Pro Phe  
 100 105 110

Leu Ala Tyr Gly Ala Phe Gly Ser Phe Val Leu Cys Trp Phe Phe Ile  
 115 120 125

Val Ser His Asn Leu Glu Ala Leu Thr Pro Val Asn Leu Asn Lys Ser  
 130 135 140

Thr Lys Asn Asp Trp Gly Ala Trp Gln Ile Glu Thr Ser Ala Ser Trp  
 145 150 155 160

Gly Asn Ala Phe Trp Ser Phe Phe Ser Gly Gly Leu Asn Leu Gln Ile  
 165 170 175

Glu His His Leu Phe Pro Gly Met Ala His Asn Leu Tyr Pro Lys Met  
 180 185 190

Val Pro Ile Ile Lys Asp Glu Cys Ala Lys Ala Gly Val Arg Tyr Thr  
 195 200 205

Gly Tyr Gly Gly Tyr Thr Gly Leu Leu Pro Ile Thr Arg Asp Met Phe  
 210 215 220

155

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(714)

&lt;223&gt; Delta-5-Desaturase

&lt;400&gt; 93

atg gtg agc cat cac tcg tac tgt aac gac gcg gat ttg gat cag gat	48
Met Val Ser His His Ser Tyr Cys Asn Asp Ala Asp Leu Asp Gln Asp	
1 5 10 15	
gtg tac acc gca ctg ccg ctc ctg cgc ctg gac ccg tct cag gag ttg	96
Val Tyr Thr Ala Leu Pro Leu Leu Arg Leu Asp Pro Ser Gln Glu Leu	
20 25 30	
aag tgg ttt cat cga tac cag gcg ttt tac gcc ccg ctc atg tgg ccg	144
Lys Trp Phe His Arg Tyr Gln Ala Phe Tyr Ala Pro Leu Met Trp Pro	
35 40 45	
ttt ttg tgg ctc gcg gcg cag ttt ggc gac gcg cag aac atc ctg atc	192
Phe Leu Trp Leu Ala Ala Gln Phe Gly Asp Ala Gln Asn Ile Leu Ile	
50 55 60	
gac cga gcg tcg ccg ggc gtc gcg tac aag gga ttg atg gcg aac gag	240
Asp Arg Ala Ser Pro Gly Val Ala Tyr Lys Gly Leu Met Ala Asn Glu	
65 70 75 80	
gtc gcg ctg tac gtt ctc ggt aag gtt tta cac ttt ggt ctt ctc ctc	288
Val Ala Leu Tyr Val Leu Gly Lys Val Leu His Phe Gly Leu Leu Leu	
85 90 95	
ggc gtt cct gcg tac ttg cac gga ttg tcc aac gcg atc gtt cca ttc	336
Gly Val Pro Ala Tyr Leu His Gly Leu Ser Asn Ala Ile Val Pro Phe	
100 105 110	
ttg gcg tac ggc gca ttc ggc tcc ttc gtc ctg tgc tgg ttc ttc atc	384
Leu Ala Tyr Gly Ala Phe Gly Ser Phe Val Leu Cys Trp Phe Phe Ile	
115 120 125	
gtc agc cat aac ctc gaa gcg ctg aca ccc gtt aac ctt aac aag tcc	432
Val Ser His Asn Leu Glu Ala Leu Thr Pro Val Asn Leu Asn Lys Ser	
130 135 140	
acg aag aac gac tgg ggg gcg tgg cag atc gag aca tcg gcg tct tgg	480
Thr Lys Asn Asp Trp Gly Ala Trp Gln Ile Glu Thr Ser Ala Ser Trp	
145 150 155 160	
ggc aac gcg ttc tgg agc ttc ttc tct gga ggt ctg aac ctg caa atc	528
Gly Asn Ala Phe Trp Ser Phe Phe Ser Gly Gly Leu Asn Leu Gln Ile	
165 170 175	
gag cac cac ctc ttc ccg ggc atg gcg cac aac ctg tac ccg aag atg	576
Glu His His Leu Phe Pro Gly Met Ala His Asn Leu Tyr Pro Lys Met	
180 185 190	
gtg ccg atc atc aag gac gag tgt gcg aaa gcg ggc gtt cgc tac acc	624
Val Pro Ile Ile Lys Asp Glu Cys Ala Lys Ala Gly Val Arg Tyr Thr	
195 200 205	
ggt tac ggt ggc tac acc ggc ctg ctc ccg atc acc cgc gac atg ttc	672
Gly Tyr Gly Gly Tyr Thr Gly Leu Leu Pro Ile Thr Arg Asp Met Phe	
210 215 220	
tcc tac ctc cat aag tgt ggc cga acg gcg aaa cta gcc taa	714
Ser Tyr Leu His Lys Cys Gly Arg Thr Ala Lys Leu Ala	
225 230 235	

154

&lt;400&gt; 92

Met Tyr Gly Leu Leu Ser Leu Lys Ser Cys Phe Val Asp Asp Phe Asn  
 1 5 10 15

Ala Tyr Phe Ser Gly Arg Ile Gly Trp Val Lys Val Met Lys Phe Thr  
 20 25 30

Arg Gly Glu Ala Ile Ala Phe Trp Gly Thr Lys Leu Leu Trp Ala Ala  
 35 40 45

Tyr Tyr Leu Ala Leu Pro Leu Lys Met Ser His Arg Pro Leu Gly Glu  
 50 55 60

Leu Leu Ala Leu Trp Ala Val Thr Glu Phe Val Thr Gly Trp Leu Leu  
 65 70 75 80

Ala Phe Met Phe Gln Val Ala His Val Val Gly Glu Val His Phe Phe  
 85 90 95

Thr Leu Asp Ala Lys Asn Arg Val Asn Leu Gly Trp Gly Glu Ala Gln  
 100 105 110

Leu Met Ser Ser Ala Asp Phe Ala His Gly Ser Lys Phe Trp Thr His  
 115 120 125

Phe Ser Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Val Val His His Leu Phe Pro Gly  
 130 135 140

Val Cys His Val His Tyr Pro Ala Leu Ala Pro Ile Ile Lys Ala Ala  
 145 150 155 160

Ala Glu Lys His Gly Leu His Tyr Gln Ile Tyr Pro Thr Phe Trp Ser  
 165 170 175

Ala Leu Arg Ala His Phe Arg His Leu Ala Asn Val Gly Arg Ala Ala  
 180 185 190

Tyr Val Pro Ser Leu Gln Thr Val Gly  
 195 200

&lt;210&gt; 93

&lt;211&gt; 714

&lt;212&gt; DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

&lt;220&gt;

153

&lt;222&gt; (1)..(606)

&lt;223&gt; Delta-5-Desaturase

&lt;400&gt; 91

atg tac ggt ttg cta tgc ctc aag tgc tgc ttc gtc gac gat ttc aac	48
Met Tyr Gly Leu Leu Ser Leu Lys Ser Cys Phe Val Asp Asp Phe Asn	
1 5 10 15	
gcc tac ttc tcc gga cgc atc ggc tgg gtc aag gtg atg aag ttc acc	96
Ala Tyr Phe Ser Gly Arg Ile Gly Trp Val Lys Val Met Lys Phe Thr	
20 25 30	
cgc ggc gag gcg atc gca ttt tgg ggc acc aag ctc ttg tgg gcc gcg	144
Arg Gly Glu Ala Ile Ala Phe Trp Gly Thr Lys Leu Leu Trp Ala Ala	
35 40 45	
tat tac ctc gcg ttg ccg cta aag atg tgc cat cgg ccg ctc gga gaa	192
Tyr Tyr Leu Ala Leu Pro Leu Lys Met Ser His Arg Pro Leu Gly Glu	
50 55 60	
ctc ctc gca ctc tgg gcc gtc acc gag ttc gtc acc gga tgg ctg ttg	240
Leu Leu Ala Leu Trp Ala Val Thr Glu Phe Val Thr Gly Trp Leu Leu	
65 70 75 80	
gcg ttc atg ttc caa gtc gcc cac gtc gtc ggc gag gtt cac ttc ttc	288
Ala Phe Met Phe Gln Val Ala His Val Val Gly Glu Val His Phe Phe	
85 90 95	
acc ctc gac gcg aag aac cgc gtg aac ttg gga tgg gga gag gca cag	336
Thr Leu Asp Ala Lys Asn Arg Val Asn Leu Gly Trp Gly Glu Ala Gln	
100 105 110	
ctc atg tgc agc gcg gat ttc gcc cac gga tcc aag ttt tgg acg cac	384
Leu Met Ser Ser Ala Asp Phe Ala His Gly Ser Lys Phe Trp Thr His	
115 120 125	
ttc tcc gga ggc tta aac tac caa gtc gtc cac cat ctc ttc ccg ggc	432
Phe Ser Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Val Val His His Leu Phe Pro Gly	
130 135 140	
gtc tgc cac gtg cac tat ccc gcg ctc gcg cca att att aag gcg gca	480
Val Cys His Val His Tyr Pro Ala Leu Ala Pro Ile Ile Lys Ala Ala	
145 150 155 160	
gct gag aag cac ggc ctc cac tac cag att tac ccc acg ttt tgg tcc	528
Ala Glu Lys His Gly Leu His Tyr Gln Ile Tyr Pro Thr Phe Trp Ser	
165 170 175	
gcc ctg cgc gcg cac ttc cgg cac ctc gcc aac gtc ggc cgc gcc gcg	576
Ala Leu Arg Ala His Phe Arg His Leu Ala Asn Val Gly Arg Ala Ala	
180 185 190	
tac gta ccg tcc ctc caa acc gtc gga tga	606
Tyr Val Pro Ser Leu Gln Thr Val Gly	
195 200	

&lt;210&gt; 92

&lt;211&gt; 201

&lt;212&gt; PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

## 152

Gly Phe Ser Lys Tyr Trp Leu Arg Leu Gln Ala Trp Thr Phe Ile Pro  
 260 265 270

Val Thr Ser Gly Leu Val Leu Leu Phe Trp Met Phe Phe Leu His Pro  
 275 280 285

Ser Lys Ala Leu Lys Gly Gly Lys Tyr Glu Glu Leu Val Trp Met Leu  
 290 295 300

Ala Ala His Val Ile Arg Thr Trp Thr Ile Lys Ala Val Thr Gly Phe  
 305 310 315 320

Thr Ala Met Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Leu Ala Thr Ser Trp Val Ser  
 325 330 335

Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp  
 340 345 350

Val Val Pro Ala Asp Glu His Leu Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp  
 355 360 365

His Thr Ile Asp Ile Asp Pro Ser Gln Gly Trp Val Asn Trp Leu Met  
 370 375 380

Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile His His Leu Phe Pro Ser Met Pro  
 385 390 395 400

Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser Arg Arg Phe Val Ala Phe Ala Lys  
 405 410 415

Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val Met Thr Tyr Ala Gly Ala Trp Lys  
 420 425 430

Ala Thr Leu Gly Asn Leu Asp Asn Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His  
 435 440 445

Gly Gln His Ser Gly Lys Thr Ala  
 450 455

<210> 91

<211> 606

<212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> CDS



151

<213> *Ostreococcus tauri*

&lt;400&gt; 90

Met Cys Val Glu Thr Glu Asn Asn Asp Gly Ile Pro Thr Val Glu Ile  
 1 5 10 15

Ala Phe Asp Gly Glu Arg Glu Arg Ala Glu Ala Asn Val Lys Leu Ser  
 20 25 30

Ala Glu Lys Met Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Thr Phe Ala Arg Arg  
 35 40 45

Tyr Val Val Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val Thr Asp Phe Lys His  
 50 55 60

Pro Gly Gly Thr Val Ile Phe Tyr Ala Leu Ser Asn Thr Gly Ala Asp  
 65 70 75 80

Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His His Arg Ser Arg Lys Ala Arg  
 85 90 95

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala Lys Thr Ala Lys Val  
 100 105 110

Asp Asp Ala Glu Met Leu Gln Asp Phe Ala Lys Trp Arg Lys Glu Leu  
 115 120 125

Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg  
 130 135 140

Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Tyr Ala Leu Gly Thr Tyr Leu Met Tyr  
 145 150 155 160

Ala Arg Tyr Val Val Ser Ser Val Leu Val Tyr Ala Cys Phe Phe Gly  
 165 170 175

Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu Gly Gly His Ser Ser Leu Thr  
 180 185 190

Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg Ile Gln Ala Phe Thr Ala Gly Phe  
 195 200 205

Gly Leu Ala Gly Ser Gly Asp Met Trp Asn Ser Met His Asn Lys His  
 210 215 220

His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr  
 225 230 235 240

Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg  
 245 250 255

## 150

cac gcg acg cct caa aag gtt cgt cac gac atg gat ctg gac acc acc 720  
 His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr  
 225 230 235 240

ccc gcg gtg gcg ttc ttc aac acc gcg gtg gaa gac aat cgt ccc cgt 768  
 Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg  
 245 250 255

ggc ttt agc aag tac tgg ttg cgc ctt cag gcg tgg acc ttc atc ccc 816  
 Gly Phe Ser Lys Tyr Trp Leu Arg Leu Gln Ala Trp Thr Phe Ile Pro  
 260 265 270

gtg acg tcc ggc ttg gtg ctc ctt ttc tgg atg ttt ttc ctc cac ccc 864  
 Val Thr Ser Gly Leu Val Leu Phe Trp Met Phe Phe Leu His Pro  
 275 280 285

tcc aag gct ttg aag ggt ggc aag tac gaa gag ttg gtg tgg atg ctc 912  
 Ser Lys Ala Leu Lys Gly Gly Lys Tyr Glu Glu Leu Val Trp Met Leu  
 290 295 300

gcc gcg cac gtc atc cgc acg tgg acg atc aag gcg gtg acc gga ttc 960  
 Ala Ala His Val Ile Arg Thr Trp Thr Ile Lys Ala Val Thr Gly Phe  
 305 310 315 320

acc gcg atg cag tcc tac ggc tta ttt ttg gcg acg agc tgg gtg agc 1008  
 Thr Ala Met Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Leu Ala Thr Ser Trp Val Ser  
 325 330 335

ggc tgc tat ctg ttt gca cac ttc tcc acg tcg cac acg cac ctg gat 1056  
 Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp  
 340 345 350

gtg gtg ccc gcg gac gag cat ctc tcc tgg gtt cga tac gcc gtc gat 1104  
 Val Val Pro Ala Asp Glu His Leu Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp  
 355 360 365

cac acg atc gac atc gat ccg agt caa ggt tgg gtg aac tgg ttg atg 1152  
 His Thr Ile Asp Ile Asp Pro Ser Gln Gly Trp Val Asn Trp Leu Met  
 370 375 380

ggc tac ctc aac tgc caa gtc atc cac cac ctc ttt ccg agc atg ccg 1200  
 Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile His His Leu Phe Pro Ser Met Pro  
 385 390 395 400

cag ttc cgc cag ccc gag gta tct cgc cgc ttc gtc gcc ttt gcg aaa 1248  
 Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser Arg Arg Phe Val Ala Phe Ala Lys  
 405 410 415

aag tgg aac ctc aac tac aag gtc atg acc tac gcc ggt gcg tgg aag 1296  
 Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val Met Thr Tyr Ala Gly Ala Trp Lys  
 420 425 430

gca acg ctc gga aac ctc gac aac gtg ggt aag cac tac tac gtg cac 1344  
 Ala Thr Leu Gly Asn Leu Asp Asn Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His  
 435 440 445

ggc caa cac tcc gga aag acg gcg taa 1371  
 Gly Gln His Ser Gly Lys Thr Ala  
 450 455

&lt;210&gt; 90

&lt;211&gt; 456

&lt;212&gt; PRT

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1371)

&lt;223&gt; Delta-6-Desaturase

&lt;400&gt; 89

atg tgc gtg gag acg gaa aat aac gat ggg atc ccc acg gtg gag atc	48
Met Cys Val Glu Thr Glu Asn Asn Asp Gly Ile Pro Thr Val Glu Ile	
1 5 10 15	
gcg ttc gac ggt gag cgc gag cgg gcg gag gca aac gtg aag ctg tcc	96
Ala Phe Asp Gly Glu Arg Glu Arg Ala Glu Ala Asn Val Lys Leu Ser	
20 25 30	
gcg gag aag atg gag ccg gcg gcg ctg gcg aag acg ttc gcg agg cgg	144
Ala Glu Lys Met Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Thr Phe Ala Arg Arg	
35 40 45	
tac gtc gtg atc gag ggg gtg gag tac gat gtg acg gat ttt aag cac	192
Tyr Val Val Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val Thr Asp Phe Lys His	
50 55 60	
ccg gga gga acg gtt att ttc tat gcg ttg tca aac acc ggg gcg gac	240
Pro Gly Gly Thr Val Ile Phe Tyr Ala Leu Ser Asn Thr Gly Ala Asp	
65 70 75 80	
gcg acg gaa gcg ttc aag gag ttt cat cat ccg tgc aga aag gcg agg	288
Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His His Arg Ser Arg Lys Ala Arg	
85 90 95	
aaa gcc ttg gcg gcg ctc ccg tct cga ccg gcc aag acg gcc aag gtg	336
Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala Lys Thr Ala Lys Val	
100 105 110	
gac gac gcg gag atg ctc caa gat ttc gcc aag tgg ccg aaa gaa ttg	384
Asp Asp Ala Glu Met Leu Gln Asp Phe Ala Lys Trp Arg Lys Glu Leu	
115 120 125	
gag aga gat gga ttc ttc aag ccc tct ccg gcg cac gtg gcg tat cgc	432
Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg	
130 135 140	
ttc gcc gag ctc gcg gcg atg tac gct ctc ggg acg tac ctg atg tac	480
Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Tyr Ala Leu Gly Thr Tyr Leu Met Tyr	
145 150 155 160	
gct cga tac gtc gtc tcc tgc gtg ctc gtg tac gct tgc ttt ttc ggc	528
Ala Arg Tyr Val Val Ser Ser Val Leu Val Tyr Ala Cys Phe Phe Gly	
165 170 175	
gcc cga tgc ggt tgg gtg cag cac gag ggc gga cac agc tgc ctg acg	576
Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu Gly Gly His Ser Ser Leu Thr	
180 185 190	
ggc aac att tgg tgg gac aag cgc atc cag gcc ttc aca gcc ggg ttc	624
Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg Ile Gln Ala Phe Thr Ala Gly Phe	
195 200 205	
ggt ctc gcc ggt agc ggc gac atg tgg aac tgc atg cac aac aag cat	672
Gly Leu Ala Gly Ser Gly Asp Met Trp Asn Ser Met His Asn Lys His	
210 215 220	

## 148

Lys Asn Thr Gly Asn Ile Asp Arg Asp Glu Val Phe Tyr Pro Gln Arg  
 130 135 140

Lys Ala Asp Asp His Pro Leu Ser Arg Asn Leu Ile Leu Ala Leu Gly  
 145 150 155 160

Ala Ala Trp Leu Ala Tyr Leu Val Glu Gly Phe Pro Pro Arg Lys Val  
 165 170 175

Asn His Phe Asn Pro Phe Glu Pro Leu Phe Val Arg Gln Val Ser Ala  
 180 185 190

Val Val Ile Ser Leu Leu Ala His Phe Phe Val Ala Gly Leu Ser Ile  
 195 200 205

Tyr Leu Ser Leu Gln Leu Gly Leu Lys Thr Met Ala Ile Tyr Tyr Tyr  
 210 215 220

Gly Pro Val Phe Val Phe Gly Ser Met Leu Val Ile Thr Thr Phe Leu  
 225 230 235 240

His His Asn Asp Glu Glu Thr Pro Trp Tyr Ala Asp Ser Glu Trp Thr  
 245 250 255

Tyr Val Lys Gly Asn Leu Ser Ser Val Asp Arg Ser Tyr Gly Ala Leu  
 260 265 270

Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr His Gln Ile His His Leu  
 275 280 285

Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Lys Lys Ala Thr Ala Ala Phe  
 290 295 300

His Gln Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys Ser Asp Glu Pro Ile Ile  
 305 310 315 320

Lys Ala Phe Phe Arg Val Gly Arg Leu Tyr Ala Asn Tyr Gly Val Val  
 325 330 335

Asp Gln Glu Ala Lys Leu Phe Thr Leu Lys Glu Ala Lys Ala Ala Thr  
 340 345 350

Glu Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Thr  
 355 360

<210> 89

<211> 1371

<212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

## 147

Ile Asp Asn Leu Ser His Asn Ile Gly Thr His Gln Ile His His Leu  
 275 280 285

ttc cct atc att ccg cac tac aaa ctc aag aaa gcc act gcg gcc ttc 912  
 Phe Pro Ile Ile Pro His Tyr Lys Leu Lys Lys Ala Thr Ala Ala Phe  
 290 295 300

cac cag gct ttc cct gag ctc gtg cgc aag agc gac gag cca att atc 960  
 His Gln Ala Phe Pro Glu Leu Val Arg Lys Ser Asp Glu Pro Ile Ile  
 305 310 315 320

aag gct ttc ttc cgg gtt gga cgt ctc tac gca aac tac ggc gtt gtg 1008  
 Lys Ala Phe Phe Arg Val Gly Arg Leu Tyr Ala Asn Tyr Gly Val Val  
 325 330 335

gac cag gag gcg aag ctc ttc acg cta aag gaa gcc aag gcg gcg acc 1056  
 Asp Gln Glu Ala Lys Leu Phe Thr Leu Lys Glu Ala Lys Ala Ala Thr  
 340 345 350

gag gcg gcg gcc aag acc aag tcc acg taa 1086  
 Glu Ala Ala Ala Lys Thr Lys Ser Thr  
 355 360

&lt;210&gt; 88

&lt;211&gt; 361

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phytophthora infestans

&lt;400&gt; 88

Met Ala Thr Lys Glu Ala Tyr Val Phe Pro Thr Leu Thr Glu Ile Lys  
 1 5 10 15

Arg Ser Leu Pro Lys Asp Cys Phe Glu Ala Ser Val Pro Leu Ser Leu  
 20 25 30

Tyr Tyr Thr Val Arg Cys Leu Val Ile Ala Val Ala Leu Thr Phe Gly  
 35 40 45

Leu Asn Tyr Ala Arg Ala Leu Pro Glu Val Glu Ser Phe Trp Ala Leu  
 50 55 60

Asp Ala Ala Leu Cys Thr Gly Tyr Ile Leu Leu Gln Gly Ile Val Phe  
 65 70 75 80

Trp Gly Phe Phe Thr Val Gly His Asp Ala Gly His Gly Ala Phe Ser  
 85 90 95

Arg Tyr His Leu Leu Asn Phe Val Val Gly Thr Phe Met His Ser Leu  
 100 105 110

Ile Leu Thr Pro Phe Glu Ser Trp Lys Leu Thr His Arg His His His  
 115 120 125

## 146

Met	Ala	Thr	Lys	Glu	Ala	Tyr	Val	Phe	Pro	Thr	Leu	Thr	Glu	Ile	Lys	
1				5					10					15		
cgg	tcg	cta	cct	aaa	gac	tgt	ttc	gag	gct	tcg	gtg	cct	ctg	tcg	ctc	96
Arg	Ser	Leu	Pro	Lys	Asp	Cys	Phe	Glu	Ala	Ser	Val	Pro	Leu	Ser	Leu	
			20					25					30			
tac	tac	acc	gtg	cgt	tgt	ctg	gtg	atc	gcg	gtg	gct	cta	acc	ttc	ggc	144
Tyr	Tyr	Thr	Val	Arg	Cys	Leu	Val	Ile	Ala	Val	Ala	Leu	Thr	Phe	Gly	
		35					40					45				
ctc	aac	tac	gct	cgc	gct	ctg	ccc	gag	gtc	gag	agc	ttc	tgg	gct	ctg	192
Leu	Asn	Tyr	Ala	Arg	Ala	Leu	Pro	Glu	Val	Glu	Ser	Phe	Trp	Ala	Leu	
	50					55					60					
gac	gcc	gca	ctc	tgc	acg	ggc	tac	atc	ttg	ctg	cag	ggc	atc	gtg	ttc	240
Asp	Ala	Ala	Leu	Cys	Thr	Gly	Tyr	Ile	Leu	Leu	Gln	Gly	Ile	Val	Phe	
65				70					75				80			
tgg	ggc	ttc	ttc	acg	gtg	ggc	cac	gat	gcc	ggc	cac	ggc	gcc	ttc	tcg	288
Trp	Gly	Phe	Phe	Thr	Val	Gly	His	Asp	Ala	Gly	His	Gly	Ala	Phe	Ser	
				85					90				95			
cgc	tac	cac	ctg	ctt	aac	ttc	gtg	gtg	ggc	act	ttc	atg	cac	tcg	ctc	336
Arg	Tyr	His	Leu	Leu	Asn	Phe	Val	Val	Gly	Thr	Phe	Met	His	Ser	Leu	
			100					105					110			
atc	ctc	acg	ccc	ttc	gag	tcg	tgg	aag	ctc	acg	cac	cgt	cac	cac	cac	384
Ile	Leu	Thr	Pro	Phe	Glu	Ser	Trp	Lys	Leu	Thr	His	Arg	His	His	His	
		115					120					125				
aag	aac	acg	ggc	aac	att	gac	cgt	gac	gag	gtc	ttc	tac	ccg	caa	cgc	432
Lys	Asn	Thr	Gly	Asn	Ile	Asp	Arg	Asp	Glu	Val	Phe	Tyr	Pro	Gln	Arg	
	130					135					140					
aag	gcc	gac	gac	cac	ccg	ctg	tct	cgc	aac	ctg	att	ctg	gcg	ctc	ggg	480
Lys	Ala	Asp	Asp	His	Pro	Leu	Ser	Arg	Asn	Leu	Ile	Leu	Ala	Leu	Gly	
145				150					155					160		
gca	gcg	tgg	ctc	gcc	tat	ttg	gtc	gag	ggc	ttc	cct	cct	cgt	aag	gtc	528
Ala	Ala	Trp	Leu	Ala	Tyr	Leu	Val	Glu	Gly	Phe	Pro	Pro	Arg	Lys	Val	
			165					170						175		
aac	cac	ttc	aac	ccg	ttc	gag	cct	ctg	ttc	gtg	cgt	cag	gtg	tca	gct	576
Asn	His	Phe	Asn	Pro	Phe	Glu	Pro	Leu	Phe	Val	Arg	Gln	Val	Ser	Ala	
			180					185					190			
gtg	gta	atc	tct	ctt	ctc	gcc	cac	ttc	ttc	gtg	gcc	gga	ctc	tcc	atc	624
Val	Val	Ile	Ser	Leu	Leu	Ala	His	Phe	Phe	Val	Ala	Gly	Leu	Ser	Ile	
		195				200						205				
tat	ctg	agc	ctc	cag	ctg	ggc	ctt	aag	acg	atg	gca	atc	tac	tac	tat	672
Tyr	Leu	Ser	Leu	Gln	Leu	Gly	Leu	Lys	Thr	Met	Ala	Ile	Tyr	Tyr	Tyr	
		210				215					220					
gga	cct	gtt	ttt	gtg	ttc	ggc	agc	atg	ctg	gtc	att	acc	acc	ttc	cta	720
Gly	Pro	Val	Phe	Val	Phe	Gly	Ser	Met	Leu	Val	Ile	Thr	Thr	Phe	Leu	
225				230					235					240		
cac	cac	aat	gat	gag	gag	acc	cca	tgg	tac	gcc	gac	tcg	gag	tgg	acg	768
His	His	Asn	Asp	Glu	Glu	Thr	Pro	Trp	Tyr	Ala	Asp	Ser	Glu	Trp	Thr	
				245				250						255		
tac	gtc	aag	ggc	aac	ctc	tcg	tcc	gtg	gac	cga	tcg	tac	ggc	gcg	ctc	816
Tyr	Val	Lys	Gly	Asn	Leu	Ser	Ser	Val	Asp	Arg	Ser	Tyr	Gly	Ala	Leu	
			260					265					270			
att	gac	aac	ctg	agc	cac	aac	atc	ggc	acg	cac	cag	atc	cac	cac	ctt	864

145

Tyr Phe Gly Ala Leu Leu Asn Ser Ile Ile His Val Leu Met Tyr Ser  
 195 200 205

Tyr Tyr Ala Leu Ala Leu Leu Lys Val Ser Cys Pro Trp Lys Arg Tyr  
 210 215 220

Leu Thr Gln Ala Gln Leu Leu Gln Phe Thr Ser Val Val Val Tyr Thr  
 225 230 235 240

Gly Cys Thr Gly Tyr Thr His Tyr Tyr His Thr Lys His Gly Ala Asp  
 245 250 255

Glu Thr Gln Pro Ser Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Cys Cys Gly Val Gln  
 260 265 270

Val Phe Glu Met Val Ser Leu Phe Val Leu Phe Ser Ile Phe Tyr Lys  
 275 280 285

Arg Ser Tyr Ser Lys Lys Asn Lys Ser Gly Gly Lys Asp Ser Lys Lys  
 290 295 300

Asn Asp Asp Gly Asn Asn Glu Asp Gln Cys His Lys Ala Met Lys Asp  
 305 310 315 320

Ile Ser Glu Gly Ala Lys Glu Val Val Gly His Ala Ala Lys Asp Ala  
 325 330 335

Gly Lys Leu Val Ala Thr Ala Ser Lys Ala Val Lys Arg Lys Gly Thr  
 340 345 350

Arg Val Thr Gly Ala Met  
 355

<210> 87

<211> 1086

<212> DNA

<213> *Phytophthora infestans*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1086)

<223> Omega-3-Desaturase

<400> 87

atg gcg acg aag gag gcg tat gtg ttc ccc act ctg acg gag atc aag

144

gga aag ttg gtg gct acg gcg agt aag gct gta aag agg aag gga act 1056  
 Gly Lys Leu Val Ala Thr Ala Ser Lys Ala Val Lys Arg Lys Gly Thr  
                   340                  345                  350

cgt gtt act ggt gcc atg tag 1077  
 Arg Val Thr Gly Ala Met  
                   355

&lt;210&gt; 86

&lt;211&gt; 358

&lt;212&gt; PRT

<213> *Thalassiosira pseudonana*

&lt;400&gt; 86

Met Cys Ser Pro Pro Pro Ser Gln Ser Lys Thr Thr Ser Leu Leu Ala  
 1                  5                  10                  15

Arg Tyr Thr Thr Ala Ala Leu Leu Leu Leu Thr Leu Thr Thr Trp Cys  
                   20                  25                  30

His Phe Ala Phe Pro Ala Ala Thr Ala Thr Pro Gly Leu Thr Ala Glu  
                   35                  40                  45

Met His Ser Tyr Lys Val Pro Leu Gly Leu Thr Val Phe Tyr Leu Leu  
                   50                  55                  60

Ser Leu Pro Ser Leu Lys Tyr Val Thr Asp Asn Tyr Leu Ala Lys Lys  
                   65                  70                  75                  80

Tyr Asp Met Lys Ser Leu Leu Thr Glu Ser Met Val Leu Tyr Asn Val  
                   85                  90                  95

Ala Gln Val Leu Leu Asn Gly Trp Thr Val Tyr Ala Ile Val Asp Ala  
                   100                  105                  110

Val Met Asn Arg Asp His Pro Phe Ile Gly Ser Arg Ser Leu Val Gly  
                   115                  120                  125

Ala Ala Leu His Ser Gly Ser Ser Tyr Ala Val Trp Val His Tyr Cys  
                   130                  135                  140

Asp Lys Tyr Leu Glu Phe Phe Asp Thr Tyr Phe Met Val Leu Arg Gly  
                   145                  150                  155                  160

Lys Met Asp Gln Val Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Thr Thr Ile  
                   165                  170                  175

Ala Trp Ala Trp Trp Ile Ala Leu Arg Phe Ser Pro Gly Gly Asp Ile  
                   180                  185                  190



143

agt cta ccg tca cta aag tac gtt acg gac aac tac ctt gcc aaa aag	240
Ser Leu Pro Ser Leu Lys Tyr Val Thr Asp Asn Tyr Leu Ala Lys Lys	
65 70 75 80	
tat gat atg aag tca ctc ctg acg gaa tca atg gtg ttg tac aat gtg	288
Tyr Asp Met Lys Ser Leu Leu Thr Glu Ser Met Val Leu Tyr Asn Val	
85 90 95	
gcg caa gtg ctg ctc aat ggg tgg acg gtg tat gcg att gtg gat gcg	336
Ala Gln Val Leu Leu Asn Gly Trp Thr Val Tyr Ala Ile Val Asp Ala	
100 105 110	
gtg atg aat aga gac cat cct ttt att gga agt aga agt ttg gtt ggg	384
Val Met Asn Arg Asp His Pro Phe Ile Gly Ser Arg Ser Leu Val Gly	
115 120 125	
gcg gcg ttg cat agt ggg agc tcg tat gcg gtg tgg gtt cat tat tgt	432
Ala Ala Leu His Ser Gly Ser Ser Tyr Ala Val Trp Val His Tyr Cys	
130 135 140	
gat aag tat ttg gag ttc ttt gat acg tat ttt atg gtg ttg agg ggg	480
Asp Lys Tyr Leu Glu Phe Phe Asp Thr Tyr Phe Met Val Leu Arg Gly	
145 150 155 160	
aaa atg gac cag gtc tcc ttc ctc cac atc tac cac cac acg acc ata	528
Lys Met Asp Gln Val Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Thr Thr Ile	
165 170 175	
gcg tgg gca tgg tgg atc gcc ctc cgc ttc tcc ccc ggc gga gac att	576
Ala Trp Ala Trp Trp Ile Ala Leu Arg Phe Ser Pro Gly Gly Asp Ile	
180 185 190	
tac ttc ggg gca ctc ctc aac tcc atc atc cac gtc ctc atg tat tcc	624
Tyr Phe Gly Ala Leu Leu Asn Ser Ile Ile His Val Leu Met Tyr Ser	
195 200 205	
tac tac gcc ctt gcc cta ctc aag gtc agt tgt cca tgg aaa cga tac	672
Tyr Tyr Ala Leu Ala Leu Leu Lys Val Ser Cys Pro Trp Lys Arg Tyr	
210 215 220	
ttg act caa gct caa tta ttg caa ttc aca agt gtg gtg gtt tat acg	720
Leu Thr Gln Ala Gln Leu Leu Gln Phe Thr Ser Val Val Val Tyr Thr	
225 230 235 240	
ggg tgt acg ggt tat act cat tac tat cat acg aag cat gga gcg gat	768
Gly Cys Thr Gly Tyr Thr His Tyr Tyr His Thr Lys His Gly Ala Asp	
245 250 255	
gag aca cag cct agt tta gga acg tat tat ttc tgt tgt gga gtg cag	816
Glu Thr Gln Pro Ser Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Cys Cys Gly Val Gln	
260 265 270	
gtg ttt gag atg gtt agt ttg ttt gta ctc ttt tcc atc ttt tat aaa	864
Val Phe Glu Met Val Ser Leu Phe Val Leu Phe Ser Ile Phe Tyr Lys	
275 280 285	
cga tcc tat tcg aag aag aac aag tca gga gga aag gat agc aag aag	912
Arg Ser Tyr Ser Lys Lys Asn Lys Ser Gly Gly Lys Asp Ser Lys Lys	
290 295 300	
aat gat gat ggg aat aat gag gat caa tgt cac aag gct atg aag gat	960
Asn Asp Asp Gly Asn Asn Glu Asp Gln Cys His Lys Ala Met Lys Asp	
305 310 315 320	
ata tcg gag ggt gcg aag gag gtt gtg ggg cat gca gcg aag gat gct	1008
Ile Ser Glu Gly Ala Lys Glu Val Val Gly His Ala Ala Lys Asp Ala	
325 330 335	

## 142

Ile Ser Phe Ile Trp Gly Ile Ile Ala Arg Phe Ala Pro Gly Gly Asp  
 165 170 175

Ala Tyr Phe Ser Thr Ile Leu Asn Ser Ser Val His Val Val Leu Tyr  
 180 185 190

Gly Tyr Tyr Ala Ser Thr Thr Leu Gly Tyr Thr Phe Met Arg Pro Leu  
 195 200 205

Arg Pro Tyr Ile Thr Thr Ile Gln Leu Thr Gln Phe Met Ala Met Val  
 210 215 220

Val Gln Ser Val Tyr Asp Tyr Tyr Asn Pro Cys Asp Tyr Pro Gln Pro  
 225 230 235 240

Leu Val Lys Leu Leu Phe Trp Tyr Met Leu Thr Met Leu Gly Leu Phe  
 245 250 255

Gly Asn Phe Phe Val Gln Gln Tyr Leu Lys Pro Lys Ala Pro Lys Lys  
 260 265 270

Gln Lys Thr Ile  
 275

<210> 85

<211> 1077

<212> DNA

<213> *Thalassiosira pseudonana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1077)

<223> Delta-5-Elongase

<400> 85

atg tgc tca cca ccg ccg tca caa tcc aaa aca aca tcc ctc cta gca 48  
 Met Cys Ser Pro Pro Pro Ser Gln Ser Lys Thr Thr Ser Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

cgg tac acc acc gcc gcc ctc ctc ctc ctc acc ctc aca acg tgg tgc 96  
 Arg Tyr Thr Thr Ala Ala Leu Leu Leu Leu Thr Leu Thr Thr Trp Cys  
 20 25 30

cac ttc gcc ttc cca gcc gcc acc gcc aca ccc ggc ctc acc gcc gaa 144  
 His Phe Ala Phe Pro Ala Ala Thr Ala Thr Pro Gly Leu Thr Ala Glu  
 35 40 45

atg cac tcc tac aaa gtc cca ctc ggt ctc acc gta ttc tac ctg ctg 192  
 Met His Ser Tyr Lys Val Pro Leu Gly Leu Thr Val Phe Tyr Leu Leu  
 50 55 60

## 141

Val Gln Ser Val Tyr Asp Tyr Tyr Asn Pro Cys Asp Tyr Pro Gln Pro  
 225 230 235 240  
 ctc gtc aag ctg ctc ttc tgg tac atg ctc acc atg ctc ggc ctc ttc 768  
 Leu Val Lys Leu Leu Phe Trp Tyr Met Leu Thr Met Leu Gly Leu Phe  
 245 250 255  
 ggc aac ttc ttc gtg cag cag tac ctc aag ccc aag gcg ccc aag aag 816  
 Gly Asn Phe Phe Val Gln Gln Tyr Leu Lys Pro Lys Ala Pro Lys Lys  
 260 265 270  
 cag aag acc atc taa 831  
 Gln Lys Thr Ile  
 275  
 <210> 84  
 <211> 276  
 <212> PRT  
 <213> Thraustochytrium sp.  
 <400> 84  
 Met Asp Val Val Glu Gln Gln Trp Arg Arg Phe Val Asp Ala Val Asp  
 1 5 10 15  
 Asn Gly Ile Val Glu Phe Met Glu His Glu Lys Pro Asn Lys Leu Asn  
 20 25 30  
 Glu Gly Lys Leu Phe Thr Ser Thr Glu Glu Met Met Ala Leu Ile Val  
 35 40 45  
 Gly Tyr Leu Ala Phe Val Val Leu Gly Ser Ala Phe Met Lys Ala Phe  
 50 55 60  
 Val Asp Lys Pro Phe Glu Leu Lys Phe Leu Lys Leu Val His Asn Ile  
 65 70 75 80  
 Phe Leu Thr Gly Leu Ser Met Tyr Met Ala Thr Glu Cys Ala Arg Gln  
 85 90 95  
 Ala Tyr Leu Gly Gly Tyr Lys Leu Phe Gly Asn Pro Met Glu Lys Gly  
 100 105 110  
 Thr Glu Ser His Ala Pro Gly Met Ala Asn Ile Ile Tyr Ile Phe Tyr  
 115 120 125  
 Val Ser Lys Phe Leu Glu Phe Leu Asp Thr Val Phe Met Ile Leu Gly  
 130 135 140  
 Lys Lys Trp Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ala Ser  
 145 150 155 160

140

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(831)

&lt;223&gt; Delta-5-Elongase

&lt;400&gt; 83

atg gac gtc gtc gag cag caa tgg cgc cgc ttc gtg gac gcc gtg gac	48
Met Asp Val Val Glu Gln Gln Trp Arg Arg Phe Val Asp Ala Val Asp	
1 5 10 15	
aac gga atc gtg gag ttc atg gag cat gag aag ccc aac aag ctg aac	96
Asn Gly Ile Val Glu Phe Met Glu His Glu Lys Pro Asn Lys Leu Asn	
20 25 30	
gag ggc aag ctc ttc acc tcg acc gag gag atg atg gcg ctt atc gtc	144
Glu Gly Lys Leu Phe Thr Ser Thr Glu Glu Met Met Ala Leu Ile Val	
35 40 45	
ggc tac ctg gcg ttc gtg gtc ctc ggg tcc gcc ttc atg aag gcc ttt	192
Gly Tyr Leu Ala Phe Val Val Leu Gly Ser Ala Phe Met Lys Ala Phe	
50 55 60	
gtc gat aag cct ttc gag ctc aag ttc ctc aag ctc gtg cac aac atc	240
Val Asp Lys Pro Phe Glu Leu Lys Phe Leu Lys Leu Val His Asn Ile	
65 70 75 80	
ttc ctc acc ggt ctg tcc atg tac atg gcc acc gag tgc gcg cgc cag	288
Phe Leu Thr Gly Leu Ser Met Tyr Met Ala Thr Glu Cys Ala Arg Gln	
85 90 95	
gca tac ctc ggc ggc tac aag ctc ttt ggc aac ccg atg gag aag ggc	336
Ala Tyr Leu Gly Gly Tyr Lys Leu Phe Gly Asn Pro Met Glu Lys Gly	
100 105 110	
acc gag tcg cac gcc ccg ggc atg gcc aac atc atc tac atc ttc tac	384
Thr Glu Ser His Ala Pro Gly Met Ala Asn Ile Ile Tyr Ile Phe Tyr	
115 120 125	
gtg agc aag ttc ctc gaa ttc ctc gac acc gtc ttc atg atc ctc ggc	432
Val Ser Lys Phe Leu Glu Phe Leu Asp Thr Val Phe Met Ile Leu Gly	
130 135 140	
aag aag tgg aag cag ctc agc ttt ctc cac gtc tac cac cac gcg agc	480
Lys Lys Trp Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ala Ser	
145 150 155 160	
atc agc ttc atc tgg ggc atc atc gcc cgc ttc gcg ccc ggt ggc gac	528
Ile Ser Phe Ile Trp Gly Ile Ile Ala Arg Phe Ala Pro Gly Gly Asp	
165 170 175	
gcc tac ttc tct acc atc ctc aac agc agc gtg cat gtc gtg ctc tac	576
Ala Tyr Phe Ser Thr Ile Leu Asn Ser Ser Val His Val Val Leu Tyr	
180 185 190	
ggc tac tac gcc tcg acc acc ctc ggc tac acc ttc atg cgc ccg ctg	624
Gly Tyr Tyr Ala Ser Thr Thr Leu Gly Tyr Thr Phe Met Arg Pro Leu	
195 200 205	
cgc ccg tac att acc acc att cag ctc acg cag ttc atg gcc atg gtc	672
Arg Pro Tyr Ile Thr Thr Ile Gln Leu Thr Gln Phe Met Ala Met Val	
210 215 220	
gtc cag tcc gtc tat gac tac tac aac ccc tgc gac tac ccg cag ccc	720

139

Ile Arg Glu Pro Thr Trp Leu Arg Arg Phe Ile Ile Cys His Asn Ala  
85 90 95

Phe Leu Ile Val Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Gly Cys Val Ala Gln  
100 105 110

Ala Tyr Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Trp Gly Asn Glu Phe Lys Ala Thr  
115 120 125

Glu Thr Gln Leu Ala Leu Tyr Ile Tyr Ile Phe Tyr Val Ser Lys Ile  
130 135 140

Tyr Glu Phe Val Asp Thr Tyr Ile Met Leu Leu Lys Asn Asn Leu Arg  
145 150 155 160

Gln Val Arg Phe Leu His Thr Tyr His His Ser Thr Ile Ser Phe Ile  
165 170 175

Trp Trp Ile Ile Ala Arg Arg Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr Phe Ser  
180 185 190

Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr Tyr Leu  
195 200 205

Leu Ser Thr Leu Ile Gly Lys Glu Asp Pro Lys Arg Ser Asn Tyr Leu  
210 215 220

Trp Trp Gly Arg His Leu Thr Gln Met Gln Met Leu Gln Phe Phe Phe  
225 230 235 240

Asn Val Leu Gln Ala Leu Tyr Cys Ala Ser Phe Ser Thr Tyr Pro Lys  
245 250 255

Phe Leu Ser Lys Ile Leu Leu Val Tyr Met Met Ser Leu Leu Gly Leu  
260 265 270

Phe Gly His Phe Tyr Tyr Ser Lys His Ile Ala Ala Ala Lys Leu Gln  
275 280 285

Lys Lys Gln Gln  
290

<210> 83

<211> 831

<212> DNA

<213> Thraustochytrium sp.

138

caa gta aga ttc cta cac act tat cac cac agc acg att tcc ttt att 528  
 Gln Val Arg Phe Leu His Thr Tyr His His Ser Thr Ile Ser Phe Ile  
 165 170 175  
 tgg tgg atc att gct cgg agg gct ccg ggt ggt gat gct tac ttc agc 576  
 Trp Trp Ile Ile Ala Arg Arg Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr Phe Ser  
 180 185 190  
 gcg gcc ttg aac tca tgg gta cac gtg tgc atg tac acc tat tat cta 624  
 Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr Tyr Leu  
 195 200 205  
 tta tca acc ctt att gga aaa gaa gat cct aag cgt tcc aac tac ctt 672  
 Leu Ser Thr Leu Ile Gly Lys Glu Asp Pro Lys Arg Ser Asn Tyr Leu  
 210 215 220  
 tgg tgg ggt cgc cac cta acg caa atg cag atg ctt cag ttt ttc ttc 720  
 Trp Trp Gly Arg His Leu Thr Gln Met Gln Met Leu Gln Phe Phe Phe  
 225 230 235 240  
 aac gta ctt caa gcg ttg tac tgc gct tcg ttc tct acg tat ccc aag 768  
 Asn Val Leu Gln Ala Leu Tyr Cys Ala Ser Phe Ser Thr Tyr Pro Lys  
 245 250 255  
 ttt ttg tcc aaa att ctg ctc gtc tat atg atg agc ctt ctc ggc ttg 816  
 Phe Leu Ser Lys Ile Leu Leu Val Tyr Met Met Ser Leu Leu Gly Leu  
 260 265 270  
 ttt ggg cat ttc tac tat tcc aag cac ata gca gca gct aag ctc cag 864  
 Phe Gly His Phe Tyr Tyr Ser Lys His Ile Ala Ala Lys Leu Gln  
 275 280 285  
 aaa aaa cag cag tga 879  
 Lys Lys Gln Gln  
 290

&lt;210&gt; 82

&lt;211&gt; 292

&lt;212&gt; PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

&lt;400&gt; 82

Met Ser Gly Leu Arg Ala Pro Asn Phe Leu His Arg Phe Trp Thr Lys  
 1 5 10 15  
 Trp Asp Tyr Ala Ile Ser Lys Val Val Phe Thr Cys Ala Asp Ser Phe  
 20 25 30  
 Gln Trp Asp Ile Gly Pro Val Ser Ser Ser Thr Ala His Leu Pro Ala  
 35 40 45  
 Ile Glu Ser Pro Thr Pro Leu Val Thr Ser Leu Leu Phe Tyr Leu Val  
 50 55 60  
 Thr Val Phe Leu Trp Tyr Gly Arg Leu Thr Arg Ser Ser Asp Lys Lys  
 65 70 75 80

## 137

Arg Gly Asp Gly Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Glu Thr Thr Arg Ala  
 275 280 285

Pro Ser Val Arg Arg Thr Arg Ser Arg Lys Ile Asp  
 290 295 300

<210> 81

<211> 879

<212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(879)

<223> Delta-6-Elongase

<400> 81  
 atg agt ggc tta cgt gca ccc aac ttt tta cac aga ttc tgg aca aag 48  
 Met Ser Gly Leu Arg Ala Pro Asn Phe Leu His Arg Phe Trp Thr Lys  
 1 5 10 15  
 tgg gac tac gcg att tcc aaa gtc gtc ttc acg tgt gcc gac agt ttt 96  
 Trp Asp Tyr Ala Ile Ser Lys Val Val Phe Thr Cys Ala Asp Ser Phe  
 20 25 30  
 cag tgg gac atc ggg cca gtg agt tcg agt acg gcg cat tta ccc gcc 144  
 Gln Trp Asp Ile Gly Pro Val Ser Ser Ser Thr Ala His Leu Pro Ala  
 35 40 45  
 att gaa tcc cct acc cca ctg gtg act agc ctc ttg ttc tac tta gtc 192  
 Ile Glu Ser Pro Thr Pro Leu Val Thr Ser Leu Leu Phe Tyr Leu Val  
 50 55 60  
 aca gtt ttc ttg tgg tat ggt cgt tta acc agg agt tca gac aag aaa 240  
 Thr Val Phe Leu Trp Tyr Gly Arg Leu Thr Arg Ser Ser Asp Lys Lys  
 65 70 75 80  
 att aga gag cct acg tgg tta aga aga ttc ata ata tgt cat aat gcg 288  
 Ile Arg Glu Pro Thr Trp Leu Arg Arg Phe Ile Ile Cys His Asn Ala  
 85 90 95  
 ttc ttg ata gtc ctc agt ctt tac atg tgc ctt ggt tgt gtg gcc caa 336  
 Phe Leu Ile Val Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Gly Cys Val Ala Gln  
 100 105 110  
 gcg tat cag aat gga tat act tta tgg ggt aat gaa ttc aag gcc acg 384  
 Ala Tyr Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Trp Gly Asn Glu Phe Lys Ala Thr  
 115 120 125  
 gaa act cag ctt gct ctc tac att tac att ttt tac gta agt aaa ata 432  
 Glu Thr Gln Leu Ala Leu Tyr Ile Tyr Ile Phe Tyr Val Ser Lys Ile  
 130 135 140  
 tac gag ttt gta gat act tac att atg ctt ctc aag aat aac ttg cgg 480  
 Tyr Glu Phe Val Asp Thr Tyr Ile Met Leu Lys Lys Asn Asn Leu Arg  
 145 150 155 160

## 136

Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Ser Ala Ala Tyr  
 1 5 10 15  
 Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly  
 20 25 30  
 Ile Asp Asn Val Asp Ala Arg Glu Trp Ile Gly Ala Leu Ser Leu Arg  
 35 40 45  
 Leu Pro Ala Ile Ala Thr Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly  
 50 55 60  
 Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met  
 65 70 75 80  
 Leu Ala Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Ala Phe Asn Val Val Val Leu Gly  
 85 90 95  
 Met Phe Ala Arg Glu Ile Ser Gly Leu Gly Gln Pro Val Trp Gly Ser  
 100 105 110  
 Thr Met Pro Trp Ser Asp Arg Lys Ser Phe Lys Ile Leu Leu Gly Val  
 115 120 125  
 Trp Leu His Tyr Asn Asn Gln Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe  
 130 135 140  
 Met Val Ala Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr  
 145 150 155 160  
 His His Ala Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Leu Val Cys His Leu Met  
 165 170 175  
 Ala Thr Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Ala Cys Asn Ser  
 180 185 190  
 Phe Ile His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Leu Gly  
 195 200 205  
 Ile Arg Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Ile Thr Gln Ala Gln Met Leu Gln  
 210 215 220  
 Phe Val Ile Val Phe Ala His Ala Val Phe Val Leu Arg Gln Lys His  
 225 230 235 240  
 Cys Pro Val Thr Leu Pro Trp Ala Gln Met Phe Val Met Thr Asn Met  
 245 250 255  
 Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Leu Lys Ala Tyr Ser Asn Lys Ser  
 260 265 270



Leu	Ala	Tyr	Asn	Ala	Tyr	Gln	Thr	Ala	Phe	Asn	Val	Val	Val	Leu	Gly	
85				90				95								
atg	ttc	gcg	cga	gag	atc	tcg	ggg	ctg	ggg	cag	ccc	gtg	tgg	ggg	tca	336
Met	Phe	Ala	Arg	Glu	Ile	Ser	Gly	Leu	Gly	Gln	Pro	Val	Trp	Gly	Ser	
100				105				110								
acc	atg	ccg	tgg	agc	gat	aga	aaa	tcg	ttt	aag	atc	ctc	ctc	ggg	gtg	384
Thr	Met	Pro	Trp	Ser	Asp	Arg	Lys	Ser	Phe	Lys	Ile	Leu	Leu	Gly	Val	
115				120				125								
tgg	ttg	cac	tac	aac	aac	caa	tat	ttg	gag	cta	ttg	gac	act	gtg	ttc	432
Trp	Leu	His	Tyr	Asn	Asn	Gln	Tyr	Leu	Glu	Leu	Leu	Asp	Thr	Val	Phe	
130				135				140								
atg	gtt	gcg	cgc	aag	aag	acg	aag	cag	ttg	agc	ttc	ttg	cac	gtt	tat	480
Met	Val	Ala	Arg	Lys	Lys	Thr	Lys	Gln	Leu	Ser	Phe	Leu	His	Val	Tyr	
145				150				155				160				
cat	cac	gcc	ctg	ttg	atc	tgg	gcg	tgg	tgg	ttg	gtg	tgt	cac	ttg	atg	528
His	His	Ala	Leu	Leu	Ile	Trp	Ala	Trp	Trp	Leu	Val	Cys	His	Leu	Met	
165				170				175								
gcc	acg	aac	gat	tgt	atc	gat	gcc	tac	ttc	ggc	gcg	gcg	tgc	aac	tcg	576
Ala	Thr	Asn	Asp	Cys	Ile	Asp	Ala	Tyr	Phe	Gly	Ala	Ala	Cys	Asn	Ser	
180				185				190								
ttc	att	cac	atc	gtg	atg	tac	tcg	tat	tat	ctc	atg	tcg	gcg	ctc	ggc	624
Phe	Ile	His	Ile	Val	Met	Tyr	Ser	Tyr	Tyr	Leu	Met	Ser	Ala	Leu	Gly	
195				200				205								
att	cga	tgc	ccg	tgg	aag	cga	tac	atc	acc	cag	gct	caa	atg	ctc	caa	672
Ile	Arg	Cys	Pro	Trp	Lys	Arg	Tyr	Ile	Thr	Gln	Ala	Gln	Met	Leu	Gln	
210				215				220								
ttc	gtc	att	gtc	ttc	gcg	cac	gcc	gtg	ttc	gtg	ctg	cgt	cag	aag	cac	720
Phe	Val	Ile	Val	Phe	Ala	His	Ala	Val	Phe	Val	Leu	Arg	Gln	Lys	His	
225				230				235				240				
tgc	ccg	gtc	acc	ctt	cct	tgg	gcg	caa	atg	ttc	gtc	atg	acg	aac	atg	768
Cys	Pro	Val	Thr	Leu	Pro	Trp	Ala	Gln	Met	Phe	Val	Met	Thr	Asn	Met	
245				250				255								
ctc	gtg	ctc	ttc	ggg	aac	ttc	tac	ctc	aag	gcg	tac	tcg	aac	aag	tcg	816
Leu	Val	Leu	Phe	Gly	Asn	Phe	Tyr	Leu	Lys	Ala	Tyr	Ser	Asn	Lys	Ser	
260				265				270								
cgc	ggc	gac	ggc	gcg	agt	tcc	gtg	aaa	cca	gcc	gag	acc	acg	cgc	gcg	864
Arg	Gly	Asp	Gly	Ala	Ser	Ser	Val	Lys	Pro	Ala	Glu	Thr	Thr	Arg	Ala	
275				280				285								
ccc	agc	gtg	cga	cgc	acg	cga	tct	cga	aaa	att	gac	taa				903
Pro	Ser	Val	Arg	Arg	Thr	Arg	Ser	Arg	Lys	Ile	Asp					
290				295				300								

<400> 80

Ile Arg Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Ile Thr Gln Ala Gln Met Leu Gln  
 210 215 220

Phe Val Ile Val Phe Ala His Ala Val Phe Val Leu Arg Gln Lys His  
 225 230 235 240

Cys Pro Val Thr Leu Pro Trp Ala Gln Met Phe Val Met Thr Asn Met  
 245 250 255

Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Leu Lys Ala Tyr Ser Asn Lys Ser  
 260 265 270

Arg Gly Asp Gly Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Glu Thr Thr Arg Ala  
 275 280 285

Pro Ser Val Arg Arg Thr Arg Ser Arg Lys Ile Asp  
 290 295 300

<210> 79

<211> 903

<212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(903)

<223> Delta-5-Elongase

<400> 79	
atg agc gcc tcc ggt gcg ctg ctg ccc gcg atc gcg tcc gcc gcg tac	48
Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Ser Ala Ala Tyr	
1 5 10 15	
gcg tac gcg acg tac gcc tac gcc ttt gag tgg tgg cac gcg aat ggc	96
Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly	
20 25 30	
atc gac aac gtc gac gcg cgc gag tgg atc ggt gcg ctg tgg ttg agg	144
Ile Asp Asn Val Asp Ala Arg Glu Trp Ile Gly Ala Leu Ser Leu Arg	
35 40 45	
ctc ccg gcg atc gcg acg acg atg tac ctg ttg ttc tgc ctg gtc gga	192
Leu Pro Ala Ile Ala Thr Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly	
50 55 60	
ccg agg ttg atg gcg aag cgc gag gcg ttc gac ccg aag ggg ttc atg	240
Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met	
65 70 75 80	
ctg gcg tac aat gcg tat cag acg gcg ttc aac gtc gtc gtg ctc ggg	288

133

ccc agc gtg cga cgc acg cga tct cga aaa att gac taa  
 Pro Ser Val Arg Arg Thr Arg Ser Arg Lys Ile Asp  
 290 295 300

903

&lt;210&gt; 78

&lt;211&gt; 300

&lt;212&gt; PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

&lt;400&gt; 78

Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Phe Ala Ala Tyr  
 1 5 10 15

Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly  
 20 25 30

Ile Asp Asn Val Asp Ala Arg Glu Trp Ile Gly Ala Leu Ser Leu Arg  
 35 40 45

Leu Pro Ala Ile Ala Thr Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly  
 50 55 60

Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met  
 65 70 75 80

Leu Ala Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Ala Phe Asn Val Val Val Leu Gly  
 85 90 95

Met Phe Ala Arg Glu Ile Ser Gly Leu Gly Gln Pro Val Trp Gly Ser  
 100 105 110

Thr Met Pro Trp Ser Asp Arg Lys Ser Phe Lys Ile Leu Leu Gly Val  
 115 120 125

Trp Leu His Tyr Asn Asn Lys Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe  
 130 135 140

Met Val Ala Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr  
 145 150 155 160

His His Ala Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Leu Val Cys His Leu Met  
 165 170 175

Ala Thr Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Ala Cys Asn Ser  
 180 185 190

Phe Ile His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Leu Gly  
 195 200 205

## 132

gcg tac gcg acg tac gcc tac gcc ttt gag tgg tgc cac gcg aat ggc Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly 20 25 30	96
atc gac aac gtc gac gcg cgc gag tgg atc ggt gcg ctg tgc ttg agg Ile Asp Asn Val Asp Ala Arg Glu Trp Ile Gly Ala Leu Ser Leu Arg 35 40 45	144
ctc ccg gcg atc gcg acg acg atg tac ctg ttg ttc tgc ctg gtc gga Leu Pro Ala Ile Ala Thr Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly 50 55 60	192
ccg agg ttg atg gcg aag cgc gag gcg ttc gac ccg aag ggg ttc atg Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met 65 70 75 80	240
ctg gcg tac aat gcg tat cag acg gcg ttc aac gtc gtc gtg ctc ggg Leu Ala Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Ala Phe Asn Val Val Val Leu Gly 85 90 95	288
atg ttc gcg cga gag atc tgc ggg ctg ggg cag ccc gtg tgg ggg tca Met Phe Ala Arg Glu Ile Ser Gly Leu Gly Gln Pro Val Trp Gly Ser 100 105 110	336
acc atg ccg tgg agc gat aga aaa tgc ttt aag atc ctc ctc ggg gtg Thr Met Pro Trp Ser Asp Arg Lys Ser Phe Lys Ile Leu Leu Gly Val 115 120 125	384
tgg ttg cac tac aac aac aaa tat ttg gag cta ttg gac act gtg ttc Trp Leu His Tyr Asn Asn Lys Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe 130 135 140	432
atg gtt gcg cgc aag aag acg aag cag ttg agc ttc ttg cac gtt tat Met Val Ala Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr 145 150 155 160	480
cat cac gcc ctg ttg atc tgg gcg tgg tgg ttg gtg tgt cac ttg atg His His Ala Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Leu Val Cys His Leu Met 165 170 175	528
gcc acg aac gat tgt atc gat gcc tac ttc ggc gcg gcg tgc aac tgc Ala Thr Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Ala Cys Asn Ser 180 185 190	576
ttc att cac atc gtg atg tac tgc tat tat ctc atg tgc gcg ctc ggc Phe Ile His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Leu Gly 195 200 205	624
att cga tgc ccg tgg aag cga tac atc acc cag gct caa atg ctc caa Ile Arg Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Ile Thr Gln Ala Gln Met Leu Gln 210 215 220	672
ttc gtc att gtc ttc gcg cac gcc gtg ttc gtg ctg cgt cag aag cac Phe Val Ile Val Phe Ala His Ala Val Phe Val Leu Arg Gln Lys His 225 230 235 240	720
tgc ccg gtc acc ctt cct tgg gcg caa atg ttc gtc atg acg aac atg Cys Pro Val Thr Leu Pro Trp Ala Gln Met Phe Val Met Thr Asn Met 245 250 255	768
ctc gtg ctc ttc ggg aac ttc tac ctc aag gcg tac tgc aac aag tgc Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Leu Lys Ala Tyr Ser Asn Lys Ser 260 265 270	816
cgc ggc gac ggc gcg agt tcc gtg aaa cca gcc gag acc acg cgc gcg Arg Gly Asp Gly Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Glu Thr Thr Arg Ala 275 280 285	864

## 131

Trp Leu His Tyr Asn Asn Lys Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe  
 130 135 140

Met Val Ala Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr  
 145 150 155 160

His His Ala Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Leu Val Cys His Leu Met  
 165 170 175

Ala Thr Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Ala Cys Asn Ser  
 180 185 190

Phe Ile His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Leu Gly  
 195 200 205

Ile Arg Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Ile Thr Gln Ala Gln Met Leu Gln  
 210 215 220

Phe Val Ile Val Phe Ala His Ala Val Phe Val Leu Arg Gln Lys His  
 225 230 235 240

Cys Pro Val Thr Leu Pro Trp Ala Gln Met Phe Val Met Thr Asn Met  
 245 250 255

Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Leu Lys Ala Tyr Ser Asn Lys Ser  
 260 265 270

Arg Gly Asp Gly Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Glu Thr Thr Arg Ala  
 275 280 285

Pro Ser Val Arg Arg Thr Arg Ser Arg Lys Ile Asp  
 290 295 300

<210> 77

<211> 903

<212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(903)

<223> Delta-5-Elongase

<400> 77

atg agc gcc tcc ggt gcg ctg ctg ccc gcg atc gcg ttc gcc gcg tac  
 Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Phe Ala Ala Tyr  
 1 5 10 15

## 130

Ile Arg Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Ile Thr Gln Ala Gln Met Leu Gln  
 210 215 220

ttc gtc att gtc ttc gcg cac gcc gtg ttc gtg ctg cgt cag aag cac 720  
 Phe Val Ile Val Phe Ala His Ala Val Phe Val Leu Arg Gln Lys His  
 225 230 235 240

tgc ccg gtc acc ctt cct tgg gcg caa atg ttc gtc atg acg aac atg 768  
 Cys Pro Val Thr Leu Pro Trp Ala Gln Met Phe Val Met Thr Asn Met  
 245 250 255

ctc gtg ctc ttc ggg aac ttc tac ctc aag gcg tac tcg aac aag tcg 816  
 Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Leu Lys Ala Tyr Ser Asn Lys Ser  
 260 265 270

cgc ggc gac ggc gcg agt tcc gtg aaa cca gcc gag acc acg cgc gcg 864  
 Arg Gly Asp Gly Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Glu Thr Thr Arg Ala  
 275 280 285

ccc agc gtg cga cgc acg cga tct cga aaa att gac taa 903  
 Pro Ser Val Arg Arg Thr Arg Ser Arg Lys Ile Asp  
 290 295 300

&lt;210&gt; 76

&lt;211&gt; 300

&lt;212&gt; PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

&lt;400&gt; 76

Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Ser Ala Tyr  
 1 5 10 15

Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly  
 20 25 30

Ile Asp Asn Val Asp Ala Arg Glu Trp Ile Gly Ala Leu Ser Leu Arg  
 35 40 45

Leu Pro Ala Ile Ala Thr Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly  
 50 55 60

Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met  
 65 70 75 80

Leu Ala Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Ala Phe Asn Val Val Val Leu Gly  
 85 90 95

Met Phe Ala Arg Glu Ile Ser Gly Leu Gly Gln Pro Val Trp Gly Ser  
 100 105 110

Thr Met Pro Trp Ser Asp Arg Lys Ser Phe Lys Ile Leu Leu Gly Val  
 115 120 125

<213> *Ostreococcus tauri*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(903)

&lt;223&gt; Delta-5-Elongase

&lt;400&gt; 75

atg agc gcc tcc ggt gcg ctg ctg ccc gcg atc gcg tcc gcc gcg tac	48
Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Ser Ala Ala Tyr	
1 5 10 15	
gcg tac gcg acg tac gcc tac gcc ttt gag tgg tgc cac gcg aat ggc	96
Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly	
20 25 30	
atc gac aac gtc gac gcg cgc gag tgg atc ggt gcg ctg tgc ttg agg	144
Ile Asp Asn Val Asp Ala Arg Glu Trp Ile Gly Ala Leu Ser Leu Arg	
35 40 45	
ctc ccg gcg atc gcg acg acg atg tac ctg ttg ttc tgc ctg gtc gga	192
Leu Pro Ala Ile Ala Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly	
50 55 60	
ccg agg ttg atg gcg aag cgc gag gcg ttc gac ccg aag ggg ttc atg	240
Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met	
65 70 75 80	
ctg gcg tac aat gcg tat cag acg gcg ttc aac gtc gtc gtg ctc ggg	288
Leu Ala Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Ala Phe Asn Val Val Val Leu Gly	
85 90 95	
atg ttc gcg cga gag atc tgc ggg ctg ggg cag ccc gtg tgg ggg tca	336
Met Phe Ala Arg Glu Ile Ser Gly Leu Gly Gln Pro Val Trp Gly Ser	
100 105 110	
acc atg ccg tgg agc gat aga aaa tgc ttt aag atc ctc ctc ggg gtg	384
Thr Met Pro Trp Ser Asp Arg Lys Ser Phe Lys Ile Leu Leu Gly Val	
115 120 125	
tgg ttg cac tac aac aac aaa tat ttg gag cta ttg gac act gtg ttc	432
Trp Leu His Tyr Asn Asn Lys Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe	
130 135 140	
atg gtt gcg cgc aag aag acg aag cag ttg agc ttc ttg cac gtt tat	480
Met Val Ala Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr	
145 150 155 160	
cat cac gcc ctg ttg atc tgg gcg tgg tgg ttg gtg tgt cac ttg atg	528
His His Ala Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Leu Val Cys His Leu Met	
165 170 175	
gcc acg aac gat tgt atc gat gcc tac ttc ggc gcg gcg tgc aac tgc	576
Ala Thr Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Ala Cys Asn Ser	
180 185 190	
ttc att cac atc gtg atg tac tgc tat tat ctc atg tgc gcg ctc ggc	624
Phe Ile His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Leu Gly	
195 200 205	
att cga tgc ccg tgg aag cga tac atc acc cag gct caa atg ctc caa	672

Val Ser Pro Lys Phe Phe Asn Ser Leu Thr Ser Arg Phe Tyr Asp Lys  
 225 230 235 240  
 Lys Leu Asn Phe Asp Gly Val Ser Arg Phe Leu Val Cys Tyr Gln His  
 245 250 255  
 Trp Thr Phe Tyr Pro Val Met Cys Val Ala Arg Leu Asn Met Ile Ala  
 260 265 270  
 Gln Ser Phe Ile Thr Leu Phe Ser Ser Arg Glu Val Gly His Arg Ala  
 275 280 285  
 Gln Glu Ile Phe Gly Leu Ala Val Phe Trp Val Trp Phe Pro Leu Leu  
 290 295 300  
 Leu Ser Cys Leu Pro Asn Trp Ser Glu Arg Ile Met Phe Leu Leu Ala  
 305 310 315 320  
 Ser Tyr Ser Val Thr Gly Ile Gln His Val Gln Phe Ser Leu Asn His  
 325 330 335  
 Phe Ser Ser Asp Val Tyr Val Gly Pro Pro Val Ala Asn Asp Trp Phe  
 340 345 350  
 Lys Lys Gln Thr Ala Gly Thr Leu Asn Ile Ser Cys Pro Ala Trp Met  
 355 360 365  
 Asp Trp Phe His Gly Gly Leu Gln Phe Gln Val Glu His His Leu Phe  
 370 375 380  
 Pro Arg Met Pro Arg Gly Gln Phe Arg Lys Ile Ser Pro Phe Val Arg  
 385 390 395 400  
 Asp Leu Cys Lys Lys His Asn Leu Pro Tyr Asn Ile Ala Ser Phe Thr  
 405 410 415  
 Lys Ala Asn Val Leu Thr Leu Lys Thr Leu Arg Asn Thr Ala Ile Glu  
 420 425 430  
 Ala Arg Asp Leu Ser Asn Pro Thr Pro Lys Asn Met Val Trp Glu Ala  
 435 440 445  
 Val His Thr His Gly  
 450

&lt;210&gt; 75

&lt;211&gt; 903

&lt;212&gt; DNA



&lt;210&gt; 74

&lt;211&gt; 453

&lt;212&gt; PRT

<213> *Primula vialii*

&lt;400&gt; 74

Met Ala Asn Lys Ser Pro Pro Asn Pro Lys Thr Gly Tyr Ile Thr Ser  
1 5 10 15

Ser Asp Leu Lys Gly His Asn Lys Ala Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile  
20 25 30

His Gly Glu Val Tyr Asp Val Ser Ser Trp Ala Gly Leu His Pro Gly  
35 40 45

Gly Ser Ala Pro Leu Met Ala Leu Ala Gly His Asp Val Thr Asp Ala  
50 55 60

Phe Leu Ala Tyr His Pro Pro Ser Thr Ala Arg Leu Leu Pro Pro Leu  
65 70 75 80

Ser Thr Asn Leu Leu Leu Gln Asn His Ser Val Ser Pro Thr Ser Ser  
85 90 95

Asp Tyr Arg Lys Leu Leu His Asn Phe His Lys Ile Gly Met Phe Arg  
100 105 110

Ala Arg Gly His Thr Ala Tyr Ala Thr Phe Val Ile Met Ile Val Met  
115 120 125

Phe Leu Thr Ser Val Thr Gly Val Leu Cys Ser Asp Ser Ala Trp Val  
130 135 140

His Leu Ala Ser Gly Ala Ala Met Gly Phe Ala Trp Ile Gln Cys Gly  
145 150 155 160

Trp Ile Gly His Asp Ser Gly His Tyr Arg Ile Met Ser Asp Arg Lys  
165 170 175

Trp Asn Trp Phe Ala Gln Val Leu Ser Thr Asn Cys Leu Gln Gly Ile  
180 185 190

Ser Ile Gly Trp Trp Lys Trp Asn His Asn Ala His His Ile Ala Cys  
195 200 205

Asn Ser Leu Asp Tyr Asp Pro Asp Leu Gln Tyr Ile Pro Leu Leu Val  
210 215 220

## 126

agt atc ggg tgg tgg aag tgg aac cat aac gcc cac cac att gct tgc 624  
 Ser Ile Gly Trp Trp Lys Trp Asn His Asn Ala His Ile Ala Cys  
 195 200 205

aat agc ctg gac tac gac ccc gac ctc cag tat atc cct ttg ctc gtg 672  
 Asn Ser Leu Asp Tyr Asp Pro Asp Leu Gln Tyr Ile Pro Leu Leu Val  
 210 215 220

gtc tcc ccc aag ttc ttc aac tcc ctt act tct cgt ttc tac gac aag 720  
 Val Ser Pro Lys Phe Phe Asn Ser Leu Thr Ser Arg Phe Tyr Asp Lys  
 225 230 235 240

aag ctg aat ttc gac ggc gtg tca agg ttt ctg gtt tgc tac cag cac 768  
 Lys Leu Asn Phe Asp Gly Val Ser Arg Phe Leu Val Cys Tyr Gln His  
 245 250 255

tgg acg ttt tat cca gtc atg tgt gtc gct agg cta aac atg atc gca 816  
 Trp Thr Phe Tyr Pro Val Met Cys Val Ala Arg Leu Asn Met Ile Ala  
 260 265 270

cag tcg ttt ata acg ctt ttc tcg agc agg gag gtg ggt cat agg gcg 864  
 Gln Ser Phe Ile Thr Leu Phe Ser Ser Arg Glu Val Gly His Arg Ala  
 275 280 285

caa gag att ttc gga ctt gct gtg ttt tgg gtt tgg ttt ccg ctc ctg 912  
 Gln Glu Ile Phe Gly Leu Ala Val Phe Trp Val Trp Phe Pro Leu Leu  
 290 295 300

ctc tct tgc tta cct aat tgg agc gag agg att atg ttt ctg cta gcg 960  
 Leu Ser Cys Leu Pro Asn Trp Ser Glu Arg Ile Met Phe Leu Leu Ala  
 305 310 315 320

agc tat tcc gtt acg ggg ata cag cac gtg cag ttc agc ttg aac cat 1008  
 Ser Tyr Ser Val Thr Gly Ile Gln His Val Gln Phe Ser Leu Asn His  
 325 330 335

ttt tct tcg gac gtc tac gtg ggc ccg cca gta gct aac gac tgg ttc 1056  
 Phe Ser Ser Asp Val Tyr Val Gly Pro Pro Val Ala Asn Asp Trp Phe  
 340 345 350

aag aaa cag act gct ggg aca ctt aac ata tcg tgc ccg gcg tgg atg 1104  
 Lys Lys Gln Thr Ala Gly Thr Leu Asn Ile Ser Cys Pro Ala Trp Met  
 355 360 365

gac tgg ttc cat ggc ggg ttg cag ttt cag gtc gag cac cac ttg ttt 1152  
 Asp Trp Phe His Gly Gly Leu Gln Phe Gln Val Glu His His Leu Phe  
 370 375 380

ccg cgg atg cct agg ggt cag ttt agg aag att tct cct ttt gtg agg 1200  
 Pro Arg Met Pro Arg Gly Gln Phe Arg Lys Ile Ser Pro Phe Val Arg  
 385 390 395 400

gat ttg tgt aag aaa cac aac ttg cct tac aat atc gcg tct ttt act 1248  
 Asp Leu Cys Lys Lys His Asn Leu Pro Tyr Asn Ile Ala Ser Phe Thr  
 405 410 415

aaa gca aac gtg ttg acg ctt aag acg ctg aga aat acg gcc att gag 1296  
 Lys Ala Asn Val Leu Thr Leu Lys Thr Leu Arg Asn Thr Ala Ile Glu  
 420 425 430

gct cgg gac ctc tct aat ccg acc cca aag aat atg gtg tgg gaa gcc 1344  
 Ala Arg Asp Leu Ser Asn Pro Thr Pro Lys Asn Met Val Trp Glu Ala  
 435 440 445

gtc cac aca cac ggc tag 1362  
 Val His Thr His Gly  
 450

125

&lt;210&gt; 73

&lt;211&gt; 1362

&lt;212&gt; DNA

<213> *Primula vialii*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(1362)

&lt;223&gt; Delta-6-Desaturase

```

<400> 73
atg gct aac aaa tct cca cca aac ccc aaa aca ggt tac att acc agc      48
Met Ala Asn Lys Ser Pro Pro Asn Pro Lys Thr Gly Tyr Ile Thr Ser
1          5          10          15

tca gac ctg aaa ggg cac aac aaa gca gga gac cta tgg ata tca atc      96
Ser Asp Leu Lys Gly His Asn Lys Ala Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile
          20          25          30

cac ggg gag gta tac gac gtg tcc tcg tgg gcc ggc ctt cac ccg ggg      144
His Gly Glu Val Tyr Asp Val Ser Ser Trp Ala Gly Leu His Pro Gly
          35          40          45

ggc agt gcc ccc ctc atg gcc ctc gca gga cac gac gta acc gac gct      192
Gly Ser Ala Pro Leu Met Ala Leu Ala Gly His Asp Val Thr Asp Ala
          50          55          60

ttt cta gcg tat cat cct cct tct acc gcc cgc ctc ctc cct ccc ctc      240
Phe Leu Ala Tyr His Pro Pro Ser Thr Ala Arg Leu Leu Pro Pro Leu
          65          70          75          80

tcc acc aac ctc ctc ctt caa aac cac tcc gtc tcc ccc acc tcc tct      288
Ser Thr Asn Leu Leu Leu Gln Asn His Ser Val Ser Pro Thr Ser Ser
          85          90          95

gac tac cgc aaa ctc ctc cac aac ttc cat aaa att ggt atg ttc cgc      336
Asp Tyr Arg Lys Leu Leu His Asn Phe His Lys Ile Gly Met Phe Arg
          100          105          110

gcc agg ggc cac act gct tac gcc acc ttc gtc atc atg ata gtg atg      384
Ala Arg Gly His Thr Ala Tyr Ala Thr Phe Val Ile Met Ile Val Met
          115          120          125

ttt cta acg agc gtg acc gga gtc ctt tgc agc gac agt gcg tgg gtc      432
Phe Leu Thr Ser Val Thr Gly Val Leu Cys Ser Asp Ser Ala Trp Val
          130          135          140

cat ctg gct agc ggc gca gca atg ggg ttc gcc tgg atc cag tgc gga      480
His Leu Ala Ser Gly Ala Ala Met Gly Phe Ala Trp Ile Gln Cys Gly
          145          150          155          160

tgg ata ggt cac gac tct ggg cat tac cgg att atg tct gac agg aaa      528
Trp Ile Gly His Asp Ser Gly His Tyr Arg Ile Met Ser Asp Arg Lys
          165          170          175

tgg aac tgg ttc gcg cag gtc ctg agc aca aac tgc ctc cag ggg atc      576
Trp Asn Trp Phe Ala Gln Val Leu Ser Thr Asn Cys Leu Gln Gly Ile
          180          185          190

```

## 124

Ser Ile Gly Trp Trp Lys Trp Asn His Asn Ala His His Ile Ala Cys  
 195 200 205

Asn Ser Leu Asp Tyr Asp Pro Asp Leu Gln Tyr Ile Pro Leu Leu Val  
 210 215 220

Val Ser Pro Lys Phe Phe Asn Ser Leu Thr Ser Arg Phe Tyr Asp Lys  
 225 230 235 240

Lys Leu Asn Phe Asp Gly Val Ser Arg Phe Leu Val Cys Tyr Gln His  
 245 250 255

Trp Thr Phe Tyr Pro Val Met Cys Val Ala Arg Leu Asn Met Leu Ala  
 260 265 270

Gln Ser Phe Ile Thr Leu Phe Ser Ser Arg Glu Val Cys His Arg Ala  
 275 280 285

Gln Glu Val Phe Gly Leu Ala Val Phe Trp Val Trp Phe Pro Leu Leu  
 290 295 300

Leu Ser Cys Leu Pro Asn Trp Gly Glu Arg Ile Met Phe Leu Leu Ala  
 305 310 315 320

Ser Tyr Ser Val Thr Gly Ile Gln His Val Gln Phe Ser Leu Asn His  
 325 330 335

Phe Ser Ser Asp Val Tyr Val Gly Pro Pro Val Gly Asn Asp Trp Phe  
 340 345 350

Lys Lys Gln Thr Ala Gly Thr Leu Asn Ile Ser Cys Pro Ala Trp Met  
 355 360 365

Asp Trp Phe His Gly Gly Leu Gln Phe Gln Val Glu His His Leu Phe  
 370 375 380

Pro Arg Met Pro Arg Gly Gln Phe Arg Lys Ile Ser Pro Phe Val Arg  
 385 390 395 400

Asp Leu Cys Lys Lys His Asn Leu Pro Tyr Asn Ile Ala Ser Phe Thr  
 405 410 415

Lys Ala Asn Val Phe Thr Leu Lys Thr Leu Arg Asn Thr Ala Ile Glu  
 420 425 430

Ala Arg Asp Leu Ser Asn Pro Leu Pro Lys Asn Met Val Trp Glu Ala  
 435 440 445

Leu Lys Thr Leu Gly  
 450

## 123

Ala Arg Asp Leu Ser Asn Pro Leu Pro Lys Asn Met Val Trp Glu Ala  
 435 440 445

ctt aaa act ctc ggg tga  
 Leu Lys Thr Leu Gly  
 450

1362

&lt;210&gt; 72

&lt;211&gt; 453

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Primula farinosa

&lt;400&gt; 72

Met Ala Asn Lys Ser Pro Pro Asn Pro Lys Thr Gly Tyr Ile Thr Ser  
 1 5 10 15

Ser Asp Leu Lys Ser His Asn Lys Ala Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile  
 20 25 30

His Gly Gln Val Tyr Asp Val Ser Ser Trp Ala Ala Leu His Pro Gly  
 35 40 45

Gly Thr Ala Pro Leu Met Ala Leu Ala Gly His Asp Val Thr Asp Ala  
 50 55 60

Phe Leu Ala Tyr His Pro Pro Ser Thr Ala Arg Leu Leu Pro Pro Leu  
 65 70 75 80

Ser Thr Asn Leu Leu Leu Gln Asn His Ser Val Ser Pro Thr Ser Ser  
 85 90 95

Asp Tyr Arg Lys Leu Leu Asp Asn Phe His Lys His Gly Leu Phe Arg  
 100 105 110

Ala Arg Gly His Thr Ala Tyr Ala Thr Phe Val Phe Met Ile Ala Met  
 115 120 125

Phe Leu Met Ser Val Thr Gly Val Leu Cys Ser Asp Ser Ala Trp Val  
 130 135 140

His Leu Ala Ser Gly Gly Ala Met Gly Phe Ala Trp Ile Gln Cys Gly  
 145 150 155 160

Trp Ile Gly His Asp Ser Gly His Tyr Arg Ile Met Ser Asp Arg Lys  
 165 170 175

Trp Asn Trp Phe Ala Gln Ile Leu Ser Thr Asn Cys Leu Gln Gly Ile  
 180 185 190

## 122

Trp Ile Gly His Asp Ser Gly His Tyr Arg Ile Met Ser Asp Arg Lys	
165	170 175
tgg aac tgg ttc gcg caa atc cta agc aca aac tgc ctc cag ggg att	576
Trp Asn Trp Phe Ala Gln Ile Leu Ser Thr Asn Cys Leu Gln Gly Ile	
180 185 190	
agt atc ggg tgg tgg aag tgg aac cat aat gcg cac cac atc gct tgc	624
Ser Ile Gly Trp Trp Lys Trp Asn His Asn Ala His His Ile Ala Cys	
195 200 205	
aat agc ctg gat tac gac ccc gac ctc cag tat atc cct ttg ctc gtc	672
Asn Ser Leu Asp Tyr Asp Pro Asp Leu Gln Tyr Ile Pro Leu Leu Val	
210 215 220	
gtc tcc ccc aag ttc ttc aac tcc ctt act tct cgt ttc tac gac aag	720
Val Ser Pro Lys Phe Phe Asn Ser Leu Thr Ser Arg Phe Tyr Asp Lys	
225 230 235 240	
aag ctg aac ttc gac ggc gtg tgc agg ttt ctg gtt tgc tac cag cac	768
Lys Leu Asn Phe Asp Gly Val Ser Arg Phe Leu Val Cys Tyr Gln His	
245 250 255	
tgg acg ttt tat ccg gtc atg tgt gtc gct agg ctg aac atg ctc gcg	816
Trp Thr Phe Tyr Pro Val Met Cys Val Ala Arg Leu Asn Met Leu Ala	
260 265 270	
cag tca ttt ata acg ctt ttc tgc agt agg gag gtg tgc cat agg gcg	864
Gln Ser Phe Ile Thr Leu Phe Ser Ser Arg Glu Val Cys His Arg Ala	
275 280 285	
caa gag gtt ttc gga ctt gcc gtg ttt tgg gtt tgg ttt ccg ctt tta	912
Gln Glu Val Phe Gly Leu Ala Val Phe Trp Val Trp Phe Pro Leu Leu	
290 295 300	
ctt tct tgt tta cct aat tgg ggc gag agg att atg ttt ttg ctt gcg	960
Leu Ser Cys Leu Pro Asn Trp Gly Glu Arg Ile Met Phe Leu Leu Ala	
305 310 315 320	
agc tat tcc gtt acg ggg ata caa cac gtg cag ttc agc ttg aac cat	1008
Ser Tyr Ser Val Thr Gly Ile Gln His Val Gln Phe Ser Leu Asn His	
325 330 335	
ttt tct tgc gac gtc tat gtg ggc ccg cca gta ggt aat gac tgg ttc	1056
Phe Ser Ser Asp Val Tyr Val Gly Pro Pro Val Gly Asn Asp Trp Phe	
340 345 350	
aag aaa cag act gcc ggg aca ctt aac ata tgc tgc ccg gcg tgg atg	1104
Lys Lys Gln Thr Ala Gly Thr Leu Asn Ile Ser Cys Pro Ala Trp Met	
355 360 365	
gat tgg ttc cat ggc ggg tta cag ttt cag gtc gag cac cac ttg ttt	1152
Asp Trp Phe His Gly Gly Leu Gln Phe Gln Val Glu His His Leu Phe	
370 375 380	
ccg cgg atg cct agg ggt cag ttt agg aag att tct cct ttt gtg agg	1200
Pro Arg Met Pro Arg Gly Gln Phe Arg Lys Ile Ser Pro Phe Val Arg	
385 390 395 400	
gat ttg tgt aag aaa cac aac ttg cct tac aat atc gcg tct ttt act	1248
Asp Leu Cys Lys Lys His Asn Leu Pro Tyr Asn Ile Ala Ser Phe Thr	
405 410 415	
aaa gcg aat gtg ttt acg ctt aag acg ctg aga aat acg gcc att gag	1296
Lys Ala Asn Val Phe Thr Leu Lys Thr Leu Arg Asn Thr Ala Ile Glu	
420 425 430	
gct cgg gac ctc tct aat ccg ctc cca aag aat atg gtg tgg gaa gct	1344

Lys Lys Gln Gln  
290

<210> 71

<211> 1362

<212> DNA

<213> *Primula farinosa*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1362)

<223> Delta-6-Desaturase

<400> 71  
atg gct aac aaa tct cca cca aac ccc aaa aca ggt tac ata acc agc 48  
Met Ala Asn Lys Ser Pro Pro Asn Pro Lys Thr Gly Tyr Ile Thr Ser  
1 5 10 15  
tca gac ctg aaa tcc cac aac aag gca ggt gac cta tgg ata tca atc 96  
Ser Asp Leu Lys Ser His Asn Lys Ala Gly Asp Leu Trp Ile Ser Ile  
20 25 30  
cac ggc caa gtc tac gac gtg tcc tct tgg gcc gcc ctt cat ccg ggg 144  
His Gly Gln Val Tyr Asp Val Ser Ser Trp Ala Ala Leu His Pro Gly  
35 40 45  
ggc act gcc cct ctc atg gcc ctt gca gga cac gac gtg acc gat gct 192  
Gly Thr Ala Pro Leu Met Ala Leu Ala Gly His Asp Val Thr Asp Ala  
50 55 60  
ttc ctc gcg tac cat ccc cct tcc act gcc cgt ctc ctc cct cct ctc 240  
Phe Leu Ala Tyr His Pro Pro Ser Thr Ala Arg Leu Leu Pro Pro Leu  
65 70 75 80  
tct acc aac ctc ctt ctt caa aac cac tcc gtc tcc ccc acc tcc tca 288  
Ser Thr Asn Leu Leu Leu Gln Asn His Ser Val Ser Pro Thr Ser Ser  
85 90 95  
gac tac cgc aaa ctc ctc gac aac ttc cat aaa cat ggc ctt ttc cgc 336  
Asp Tyr Arg Lys Leu Leu Asp Asn Phe His Lys His Gly Leu Phe Arg  
100 105 110  
gcc agg ggc cac act gct tac gcc acc ttc gtc ttc atg ata gcg atg 384  
Ala Arg Gly His Thr Ala Tyr Ala Thr Phe Val Phe Met Ile Ala Met  
115 120 125  
ttt cta atg agc gtg act gga gtc ctt tgc agc gac agt gcg tgg gtc 432  
Phe Leu Met Ser Val Thr Gly Val Leu Cys Ser Asp Ser Ala Trp Val  
130 135 140  
cat ttg gct agc ggc gga gca atg ggg ttc gcc tgg atc caa tgc gga 480  
His Leu Ala Ser Gly Gly Ala Met Gly Phe Ala Trp Ile Gln Cys Gly  
145 150 155 160  
tgg ata ggt cac gac tct ggg cat tac cgg att atg tct gac agg aaa 528

120

Trp Asp Tyr Ala Ile Ser Lys Val Val Phe Thr Cys Ala Asp Ser Phe  
 20 25 30

Gln Trp Asp Ile Gly Pro Val Ser Ser Ser Thr Ala His Leu Pro Ala  
 35 40 45

Ile Glu Ser Pro Thr Pro Leu Val Thr Ser Leu Leu Phe Tyr Leu Val  
 50 55 60

Thr Val Phe Leu Trp Tyr Gly Arg Leu Thr Arg Ser Ser Asp Lys Lys  
 65 70 75 80

Ile Arg Glu Pro Thr Trp Leu Arg Arg Phe Ile Ile Cys His Asn Ala  
 85 90 95

Phe Leu Ile Val Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Gly Cys Val Ala Gln  
 100 105 110

Ala Tyr Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Trp Gly Asn Glu Phe Lys Ala Thr  
 115 120 125

Glu Thr Gln Leu Ala Leu Tyr Ile Tyr Ile Phe Tyr Val Ser Lys Ile  
 130 135 140

Tyr Glu Phe Val Asp Thr Tyr Ile Met Leu Leu Lys Asn Asn Leu Arg  
 145 150 155 160

Gln Val Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Ser Thr Ile Ser Phe Ile  
 165 170 175

Trp Trp Ile Ile Ala Arg Arg Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr Phe Ser  
 180 185 190

Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr Tyr Leu  
 195 200 205

Leu Ser Thr Leu Ile Gly Lys Glu Asp Pro Lys Arg Ser Asn Tyr Leu  
 210 215 220

Trp Trp Gly Arg His Leu Thr Gln Met Gln Met Leu Gln Phe Phe Phe  
 225 230 235 240

Asn Val Leu Gln Ala Leu Tyr Cys Ala Ser Phe Ser Thr Tyr Pro Lys  
 245 250 255

Phe Leu Ser Lys Ile Leu Leu Val Tyr Met Met Ser Leu Leu Gly Leu  
 260 265 270

Phe Gly His Phe Tyr Tyr Ser Lys His Ile Ala Ala Ala Lys Leu Gln  
 275 280 285



119

ttc ttg ata gtc ctc agt ctt tac atg tgc ctt ggt tgt gtg gcc caa 336  
 Phe Leu Ile Val Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Gly Cys Val Ala Gln  
 100 105 110

gcg tat cag aat gga tat act tta tgg ggt aat gaa ttc aag gcc acg 384  
 Ala Tyr Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Trp Gly Asn Glu Phe Lys Ala Thr  
 115 120 125

gaa act cag ctt gct ctc tac att tac att ttt tac gta agt aaa ata 432  
 Glu Thr Gln Leu Ala Leu Tyr Ile Tyr Ile Phe Tyr Val Ser Lys Ile  
 130 135 140

tac gag ttt gta gat act tac att atg ctt ctc aag aat aac ttg cgg 480  
 Tyr Glu Phe Val Asp Thr Tyr Ile Met Leu Leu Lys Asn Asn Leu Arg  
 145 150 155 160

caa gta agt ttc cta cac att tat cac cac agc acg att tcc ttt att 528  
 Gln Val Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Ser Thr Ile Ser Phe Ile  
 165 170 175

tgg tgg atc att gct cgg agg gct ccg ggt ggt gat gct tac ttc agc 576  
 Trp Trp Ile Ile Ala Arg Arg Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr Phe Ser  
 180 185 190

gcg gcc ttg aac tca tgg gta cac gtg tgc atg tac acc tat tat cta 624  
 Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr Tyr Leu  
 195 200 205

tta tca acc ctt att gga aaa gaa gat cct aag cgt tcc aac tac ctt 672  
 Leu Ser Thr Leu Ile Gly Lys Glu Asp Pro Lys Arg Ser Asn Tyr Leu  
 210 215 220

tgg tgg ggt cgc cac cta acg caa atg cag atg ctt cag ttt ttc ttc 720  
 Trp Trp Gly Arg His Leu Thr Gln Met Gln Met Leu Gln Phe Phe Phe  
 225 230 235 240

aac gta ctt caa gcg ttg tac tgc gct tgc ttc tct acg tat ccc aag 768  
 Asn Val Leu Gln Ala Leu Tyr Cys Ala Ser Phe Ser Thr Tyr Pro Lys  
 245 250 255

ttt ttg tcc aaa att ctg ctc gtc tat atg atg agc ctt ctc ggc ttg 816  
 Phe Leu Ser Lys Ile Leu Leu Val Tyr Met Met Ser Leu Leu Gly Leu  
 260 265 270

ttt ggg cat ttc tac tat tcc aag cac ata gca gca gct aag ctc cag 864  
 Phe Gly His Phe Tyr Tyr Ser Lys His Ile Ala Ala Ala Lys Leu Gln  
 275 280 285

aaa aaa cag cag tga 879  
 Lys Lys Gln Gln  
 290

&lt;210&gt; 70

&lt;211&gt; 292

&lt;212&gt; PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

&lt;400&gt; 70

Met Ser Gly Leu Arg Ala Pro Asn Phe Leu His Arg Phe Trp Thr Lys  
 1 5 10 15

## 118

Ile Arg Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Ile Thr Gln Ala Gln Met Leu Gln  
 210 215 220

Phe Val Ile Val Phe Ala His Ala Val Phe Val Leu Arg Gln Lys His  
 225 230 235 240

Cys Pro Val Thr Leu Pro Trp Ala Gln Met Phe Val Met Thr Asn Met  
 245 250 255

Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Leu Lys Ala Tyr Ser Asn Lys Ser  
 260 265 270

Arg Gly Asp Gly Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Glu Thr Thr Arg Ala  
 275 280 285

Pro Ser Val Arg Arg Thr Arg Ser Arg Lys Ile Asp  
 290 295 300

<210> 69

<211> 879

<212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(879)

<223> Delta-6-Elongase

<400> 69 48  
 atg agt ggc tta cgt gca ccc aac ttt tta cac aga ttc tgg aca aag  
 Met Ser Gly Leu Arg Ala Pro Asn Phe Leu His Arg Phe Trp Thr Lys  
 1 5 10 15  
 tgg gac tac gcg att tcc aaa gtc gtc ttc acg tgt gcc gac agt ttt 96  
 Trp Asp Tyr Ala Ile Ser Lys Val Val Phe Thr Cys Ala Asp Ser Phe  
 20 25 30  
 cag tgg gac atc ggg cca gtg agt tgg agt acg gcg cat tta ccc gcc 144  
 Gln Trp Asp Ile Gly Pro Val Ser Ser Ser Thr Ala His Leu Pro Ala  
 35 40 45  
 att gaa tcc cct acc cca ctg gtg act agc ctc ttg ttc tac tta gtc 192  
 Ile Glu Ser Pro Thr Pro Leu Val Thr Ser Leu Leu Phe Tyr Leu Val  
 50 55 60  
 aca gtt ttc ttg tgg tat ggt cgt tta acc agg agt tca gac aag aaa 240  
 Thr Val Phe Leu Trp Tyr Gly Arg Leu Thr Arg Ser Ser Asp Lys Lys  
 65 70 75 80  
 att aga gag cct acg tgg tta aga aga ttc ata ata tgt cat aat gcg 288  
 Ile Arg Glu Pro Thr Trp Leu Arg Arg Phe Ile Ile Cys His Asn Ala  
 85 90 95

## 117

Pro Ser Val Arg Arg Thr Arg Ser Arg Lys Ile Asp  
 290 295 300

<210> 68

<211> 300

<212> PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

<400> 68

Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Phe Ala Ala Tyr  
 1 5 10 15

Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly  
 20 25 30

Ile Asp Asn Val Asp Ala Arg Glu Trp Ile Gly Ala Leu Ser Leu Arg  
 35 40 45

Leu Pro Ala Ile Ala Thr Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly  
 50 55 60

Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met  
 65 70 75 80

Leu Ala Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Ala Phe Asn Val Val Val Leu Gly  
 85 90 95

Met Phe Ala Arg Glu Ile Ser Gly Leu Gly Gln Pro Val Trp Gly Ser  
 100 105 110

Thr Met Pro Trp Ser Asp Arg Lys Ser Phe Lys Ile Leu Leu Gly Val  
 115 120 125

Trp Leu His Tyr Asn Asn Gln Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe  
 130 135 140

Met Val Ala Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr  
 145 150 155 160

His His Ala Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Leu Val Cys His Leu Met  
 165 170 175

Ala Thr Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Ala Cys Asn Ser  
 180 185 190

Phe Ile His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Leu Gly  
 195 200 205

## 116

Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly	
20 25 30	
atc gac aac gtc gac gcg cgc gag tgg atc ggt gcg ctg tcg ttg agg	144
Ile Asp Asn Val Asp Ala Arg Glu Trp Ile Gly Ala Leu Ser Leu Arg	
35 40 45	
ctc ccg gcg atc gcg acg acg atg tac ctg ttg ttc tgc ctg gtc gga	192
Leu Pro Ala Ile Ala Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly	
50 55 60	
ccg agg ttg atg gcg aag cgc gag gcg ttc gac ccg aag ggg ttc atg	240
Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met	
65 70 75 80	
ctg gcg tac aat gcg tat cag acg gcg ttc aac gtc gtc gtg ctc ggg	288
Leu Ala Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Ala Phe Asn Val Val Val Leu Gly	
85 90 95	
atg ttc gcg cga gag atc tcg ggg ctg ggg cag ccc gtg tgg ggg tca	336
Met Phe Ala Arg Glu Ile Ser Gly Leu Gly Gln Pro Val Trp Gly Ser	
100 105 110	
acc atg ccg tgg agc gat aga aaa tcg ttt aag atc ctc ctc ggg gtg	384
Thr Met Pro Trp Ser Asp Arg Lys Ser Phe Lys Ile Leu Leu Gly Val	
115 120 125	
tgg ttg cac tac aac aac caa tat ttg gag cta ttg gac act gtg ttc	432
Trp Leu His Tyr Asn Asn Gln Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe	
130 135 140	
atg gtt gcg cgc aag aag acg aag cag ttg agc ttc ttg cac gtt tat	480
Met Val Ala Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr	
145 150 155 160	
cat cac gcc ctg ttg atc tgg gcg tgg tgg ttg gtg tgt cac ttg atg	528
His His Ala Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Leu Val Cys His Leu Met	
165 170 175	
gcc acg aac gat tgt atc gat gcc tac ttc ggc gcg gcg tgc aac tcg	576
Ala Thr Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Ala Cys Asn Ser	
180 185 190	
ttc att cac atc gtg atg tac tcg tat tat ctc atg tcg gcg ctc ggc	624
Phe Ile His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Leu Gly	
195 200 205	
att cga tgc ccg tgg aag cga tac atc acc cag gct caa atg ctc caa	672
Ile Arg Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Ile Thr Gln Ala Gln Met Leu Gln	
210 215 220	
ttc gtc att gtc ttc gcg cac gcc gtg ttc gtg ctg cgt cag aag cac	720
Phe Val Ile Val Phe Ala His Ala Val Phe Val Leu Arg Gln Lys His	
225 230 235 240	
tgc ccg gtc acc ctt cct tgg gcg caa atg ttc gtc atg acg aac atg	768
Cys Pro Val Thr Leu Pro Trp Ala Gln Met Phe Val Met Thr Asn Met	
245 250 255	
ctc gtg ctc ttc ggg aac ttc tac ctc aag gcg tac tcg aac aag tcg	816
Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Leu Lys Ala Tyr Ser Asn Lys Ser	
260 265 270	
cgc ggc gac ggc gcg agt tcc gtg aaa cca gcc gag acc acg cgc gcg	864
Arg Gly Asp Gly Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Glu Thr Thr Arg Ala	
275 280 285	
ccc agc gtg cga cgc acg cga tct cga aaa att gac taa	903

## 115

Lys Ala Tyr Glu Phe Val Asp Thr Leu Ile Met Ile Leu Cys Lys Lys  
 130 135 140

Phe Asn Gln Val Ser Val Leu His Val Tyr His His Ala Thr Ile Phe  
 145 150 155 160

Ala Ile Trp Phe Met Ile Ala Lys Tyr Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr  
 165 170 175

Phe Ser Val Ile Leu Asn Ser Phe Val His Thr Val Met Tyr Ala Tyr  
 180 185 190

Tyr Phe Phe Ser Ser Gln Gly Phe Gly Phe Val Lys Pro Ile Lys Pro  
 195 200 205

Tyr Ile Thr Ser Leu Gln Met Thr Gln Phe Met Ala Met Leu Val Gln  
 210 215 220

Ser Leu Tyr Asp Tyr Leu Tyr Pro Cys Asp Tyr Pro Gln Gly Leu Val  
 225 230 235 240

Lys Leu Leu Gly Val Tyr Met Leu Thr Leu Leu Ala Leu Phe Gly Asn  
 245 250 255

Phe Phe Val Gln Ser Tyr Leu Lys Lys Ser Asn Lys Pro Lys Ala Lys  
 260 265 270

Ser Ala

<210> 67

<211> 903

<212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(903)

<223> Delta-5-Elongase

<400> 67

atg agc gcc tcc ggt gcg ctg ctg ccc gcg atc gcg ttc gcc gcg tac 48  
 Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Phe Ala Ala Tyr  
 1 5 10 15

gcg tac gcg acg tac gcc tac gcc ttt gag tgg tcg cac gcg aat ggc 96

114

tac ttc ttc tcg tcg cag ggc ttc ggg ttc gtc aag ccg atc aag ccg 624  
 Tyr Phe Phe Ser Ser Gln Gly Phe Gly Phe Val Lys Pro Ile Lys Pro  
 195 200 205  
 tac atc acc tcg ctg cag atg acg cag ttc atg gcg atg ctc gtg cag 672  
 Tyr Ile Thr Ser Leu Gln Met Thr Gln Phe Met Ala Met Leu Val Gln  
 210 215 220  
 tcg ctg tac gac tac ctt tac ccg tgc gac tac ccg cag ggg ctc gtc 720  
 Ser Leu Tyr Asp Tyr Leu Tyr Pro Cys Asp Tyr Pro Gln Gly Leu Val  
 225 230 235 240  
 aag ctc ctc ggc gtg tac atg ctc acc ctg ctt gcg ctc ttc ggc aac 768  
 Lys Leu Leu Gly Val Tyr Met Leu Thr Leu Leu Ala Leu Phe Gly Asn  
 245 250 255  
 ttt ttc gtg cag agc tac ctc aag aag tcg aac aag ccc aag gcc aag 816  
 Phe Phe Val Gln Ser Tyr Leu Lys Lys Ser Asn Lys Pro Lys Ala Lys  
 260 265 270  
 tcg gcc taa 825  
 Ser Ala

&lt;210&gt; 66

&lt;211&gt; 274

&lt;212&gt; PRT

<213> *Thraustochytrium aureum*.

&lt;400&gt; 66

Met Thr Ser Asn Met Ser Ala Trp Gly Val Ala Val Asp Gln Thr Gln  
 1 5 10 15

Gln Val Val Asp Gln Ile Met Gly Gly Ala Glu Pro Tyr Lys Leu Thr  
 20 25 30

Glu Gly Arg Met Thr Asn Val Glu Thr Met Leu Ala Ile Glu Cys Gly  
 35 40 45

Tyr Ala Ala Met Leu Leu Phe Leu Thr Pro Ile Met Lys Gln Ala Glu  
 50 55 60

Lys Pro Phe Glu Leu Lys Ser Phe Lys Leu Ala His Asn Leu Phe Leu  
 65 70 75 80

Phe Val Leu Ser Ala Tyr Met Cys Leu Glu Thr Val Arg Gln Ala Tyr  
 85 90 95

Leu Ala Gly Tyr Ser Val Phe Gly Asn Asp Met Glu Lys Gly Ser Glu  
 100 105 110

Pro His Ala His Gly Met Ala Gln Ile Val Trp Ile Phe Tyr Val Ser  
 115 120 125

&lt;210&gt; 65

&lt;211&gt; 825

&lt;212&gt; DNA

<213> *Thraustochytrium aureum*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(825)

&lt;223&gt; Delta-5-Elongase

&lt;400&gt; 65

atg acg agc aac atg agc gcg tgg ggc gtc gcc gtc gac cag acg cag	48
Met Thr Ser Asn Met Ser Ala Trp Gly Val Ala Val Asp Gln Thr Gln	
1 5 10 15	
cag gtc gtc gac cag atc atg ggc ggc gcc gag ccg tac aag ctg aca	96
Gln Val Val Asp Gln Ile Met Gly Gly Ala Glu Pro Tyr Lys Leu Thr	
20 25 30	
gaa ggg cgc atg acg aac gtc gag acg atg ctg gcg atc gag tgc ggc	144
Glu Gly Arg Met Thr Asn Val Glu Thr Met Leu Ala Ile Glu Cys Gly	
35 40 45	
tac gcc gcc atg ctg ctg ttc ctg acc ccg atc atg aag cag gcc gag	192
Tyr Ala Ala Met Leu Leu Phe Leu Thr Pro Ile Met Lys Gln Ala Glu	
50 55 60	
aag ccc ttc gag ctc aag tcc ttc aag ctc gcc cac aac ctg ttc ctg	240
Lys Pro Phe Glu Leu Lys Ser Phe Lys Leu Ala His Asn Leu Phe Leu	
65 70 75 80	
ttc gtc ctg tcc gcc tac atg tgc ctc gag acc gtc cgc cag gcc tac	288
Phe Val Leu Ser Ala Tyr Met Cys Leu Glu Thr Val Arg Gln Ala Tyr	
85 90 95	
ctt gcg ggc tac tcg gtg ttc ggc aac gac atg gag aag ggc agc gag	336
Leu Ala Gly Tyr Ser Val Phe Gly Asn Asp Met Glu Lys Gly Ser Glu	
100 105 110	
ccg cac gcg cac ggc atg gcc caa atc gtg tgg atc ttt tac gtg tcc	384
Pro His Ala His Gly Met Ala Gln Ile Val Trp Ile Phe Tyr Val Ser	
115 120 125	
aag gcg tac gag ttc gtg gac acg ctg atc atg atc ctg tgc aaa aag	432
Lys Ala Tyr Glu Phe Val Asp Thr Leu Ile Met Ile Leu Cys Lys Lys	
130 135 140	
ttc aac cag gtc tcc gtc ctg cac gtg tac cac cac gcc acc atc ttt	480
Phe Asn Gln Val Ser Val Leu His Val Tyr His His Ala Thr Ile Phe	
145 150 155 160	
gct atc tgg ttt atg atc gcc aag tac gcc ccg ggc ggc gac gca tac	528
Ala Ile Trp Phe Met Ile Ala Lys Tyr Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr	
165 170 175	
ttt agc gtc atc ctg aac tcg ttc gtg cac acc gtc atg tac gcg tac	576
Phe Ser Val Ile Leu Asn Ser Phe Val His Thr Val Met Tyr Ala Tyr	
180 185 190	

## 112

Ala Gln Val Leu Leu Asn Gly Trp Thr Val Tyr Ala Ile Val Asp Ala  
50 55 60

Val Met Asn Arg Asp His Pro Phe Ile Gly Ser Arg Ser Leu Val Gly  
65 70 75 80

Ala Ala Leu His Ser Gly Ser Ser Tyr Ala Val Trp Val His Tyr Cys  
85 90 95

Asp Lys Tyr Leu Glu Phe Phe Asp Thr Tyr Phe Met Val Leu Arg Gly  
100 105 110

Lys Met Asp Gln Val Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Thr Thr Ile  
115 120 125

Ala Trp Ala Trp Trp Ile Ala Leu Arg Phe Ser Pro Gly Gly Asp Ile  
130 135 140

Tyr Phe Gly Ala Leu Leu Asn Ser Ile Ile His Val Leu Met Tyr Ser  
145 150 155 160

Tyr Tyr Ala Leu Ala Leu Leu Lys Val Ser Cys Pro Trp Lys Arg Tyr  
165 170 175

Leu Thr Gln Ala Gln Leu Leu Gln Phe Thr Ser Val Val Val Tyr Thr  
180 185 190

Gly Cys Thr Gly Tyr Thr His Tyr Tyr His Thr Lys His Gly Ala Asp  
195 200 205

Glu Thr Gln Pro Ser Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Cys Cys Gly Val Gln  
210 215 220

Val Phe Glu Met Val Ser Leu Phe Val Leu Phe Ser Ile Phe Tyr Lys  
225 230 235 240

Arg Ser Tyr Ser Lys Lys Asn Lys Ser Gly Gly Lys Asp Ser Lys Lys  
245 250 255

Asn Asp Asp Gly Asn Asn Glu Asp Gln Cys His Lys Ala Met Lys Asp  
260 265 270

Ile Ser Glu Gly Ala Lys Glu Val Val Gly His Ala Ala Lys Asp Ala  
275 280 285

Gly Lys Leu Val Ala Thr Ala Ser Lys Ala Val Lys Arg Lys Gly Thr  
290 295 300

Arg Val Thr Gly Ala Met  
305 310



111

Tyr Phe Gly Ala Leu Leu Asn Ser Ile Ile His Val Leu Met Tyr Ser  
 145 150 155 160  
 tac tac gcc ctt gcc cta ctc aag gtc agt tgt cca tgg aaa cga tac 528  
 Tyr Tyr Ala Leu Ala Leu Leu Lys Val Ser Cys Pro Trp Lys Arg Tyr  
 165 170 175  
 ctg act caa gct caa tta ttg caa ttc aca agt gtg gtg gtt tat acg 576  
 Leu Thr Gln Ala Gln Leu Leu Gln Phe Thr Ser Val Val Val Tyr Thr  
 180 185 190  
 ggg tgt acg ggt tat act cat tac tat cat acg aag cat gga gcg gat 624  
 Gly Cys Thr Gly Tyr Thr His Tyr Tyr His Thr Lys His Gly Ala Asp  
 195 200 205  
 gag aca cag cct agt tta gga acg tat tat ttc tgt tgt gga gtg cag 672  
 Glu Thr Gln Pro Ser Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Cys Cys Gly Val Gln  
 210 215 220  
 gtg ttt gag atg gtt agt ttg ttt gta ctc ttt tcc atc ttt tat aaa 720  
 Val Phe Glu Met Val Ser Leu Phe Val Leu Phe Ser Ile Phe Tyr Lys  
 225 230 235 240  
 cga tcc tat tct aag aag aac aag tca gga gga aag gat agc aag aag 768  
 Arg Ser Tyr Ser Lys Lys Asn Lys Ser Gly Gly Lys Asp Ser Lys Lys  
 245 250 255  
 aat gat gat ggg aat aat gag gat caa tgt cac aag gct atg aag gat 816  
 Asn Asp Asp Gly Asn Asn Glu Asp Gln Cys His Lys Ala Met Lys Asp  
 260 265 270  
 ata tct gag ggt gcg aag gag gtt gtg ggg cat gca gcg aag gat gct 864  
 Ile Ser Glu Gly Ala Lys Glu Val Val Gly His Ala Ala Lys Asp Ala  
 275 280 285  
 gga aag ttg gtg gct acg gcg agt aag gct gta aag agg aag gga act 912  
 Gly Lys Leu Val Ala Thr Ala Ser Lys Ala Val Lys Arg Lys Gly Thr  
 290 295 300  
 cgt gtt act ggt gcc atg tag 933  
 Arg Val Thr Gly Ala Met  
 305 310

&lt;210&gt; 64

&lt;211&gt; 310

&lt;212&gt; PRT

<213> *Thalassiosira pseudonana*.

&lt;400&gt; 64

Met His Ser Tyr Lys Val Pro Leu Gly Leu Thr Val Phe Tyr Leu Leu  
 1 5 10 15

Ser Leu Pro Ser Leu Lys Tyr Val Thr Asp Asn Tyr Leu Ala Lys Lys  
 20 25 30

Tyr Asp Met Lys Ser Leu Leu Thr Glu Ser Met Val Leu Tyr Asn Val  
 35 40 45

Gly Lys Leu Val Ala Thr Ala Ser Lys Ala Val Lys Arg Lys Gly Thr  
 290 295 300

Arg Val Thr Gly Ala Met  
 305 310

<210> 63

<211> 933

<212> DNA

<213> *Thalassiosira pseudonana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(933)

<223> Delta-5-Elongase

<400> 63

atg cac tcc tac aaa gtc cca ctc ggt ctc acc gta ttc tac ctg ctg	48
Met His Ser Tyr Lys Val Pro Leu Gly Leu Thr Val Phe Tyr Leu Leu	
1 5 10 15	
agt cta ccg tca cta aag tac gtt acg gac aac tac ctt gcc aaa aag	96
Ser Leu Pro Ser Leu Lys Tyr Val Thr Asp Asn Tyr Leu Ala Lys Lys	
20 25 30	
tat gat atg aag tca ctc cta acg gaa tca atg gtg ttg tac aat gtg	144
Tyr Asp Met Lys Ser Leu Leu Thr Glu Ser Met Val Tyr Asn Val	
35 40 45	
gcg caa gtg ctg ctc aat ggg tgg acg gtg tat gcg att gtg gat gcg	192
Ala Gln Val Leu Leu Asn Gly Trp Thr Val Tyr Ala Ile Val Asp Ala	
50 55 60	
gtg atg aat aga gac cat ccg ttt att gga agt aga agt ttg gtt ggg	240
Val Met Asn Arg Asp His Pro Phe Ile Gly Ser Arg Ser Leu Val Gly	
65 70 75 80	
gcg gcg ttg cat agt ggg agc tcg tat gcg gtg tgg gtt cat tat tgt	288
Ala Ala Leu His Ser Gly Ser Ser Tyr Ala Val Trp Val His Tyr Cys	
85 90 95	
gat aag tat ttg gag ttc ttt gat acg tat ttt atg gtg ttg agg ggg	336
Asp Lys Tyr Leu Glu Phe Phe Asp Thr Tyr Phe Met Val Leu Arg Gly	
100 105 110	
aaa atg gac cag gtc tcc ttc ctc cac atc tac cac cac acg acc ata	384
Lys Met Asp Gln Val Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Thr Thr Ile	
115 120 125	
gcg tgg gca tgg tgg atc gcc ctc cgc ttc tcc ccc ggt gga gac att	432
Ala Trp Ala Trp Trp Ile Ala Leu Arg Phe Ser Pro Gly Gly Asp Ile	
130 135 140	
tac ttc ggg gca ctc ctc aac tcc atc atc cac gtc ctc atg tat tcc	480

Ser Leu Pro Ser Leu Lys Tyr Val Thr Asp Asn Tyr Leu Ala Lys Lys  
 20 25 30

Tyr Asp Met Lys Ser Leu Leu Thr Glu Ser Met Val Leu Tyr Asn Val  
 35 40 45

Ala Gln Val Leu Leu Asn Gly Trp Thr Val Tyr Ala Ile Val Asp Ala  
 50 55 60

Val Met Asn Arg Asp His Pro Phe Ile Gly Ser Arg Ser Leu Val Gly  
 65 70 75 80

Ala Ala Leu His Ser Gly Ser Ser Tyr Ala Val Trp Val His Tyr Cys  
 85 90 95

Asp Lys Tyr Leu Glu Phe Phe Asp Thr Tyr Phe Met Val Leu Arg Gly  
 100 105 110

Lys Met Asp Gln Val Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Thr Thr Ile  
 115 120 125

Ala Trp Ala Trp Trp Ile Ala Leu Arg Phe Ser Pro Gly Gly Asp Ile  
 130 135 140

Tyr Phe Gly Ala Leu Leu Asn Ser Ile Ile His Val Leu Met Tyr Ser  
 145 150 155 160

Tyr Tyr Ala Leu Ala Leu Leu Lys Val Ser Cys Pro Trp Lys Arg Tyr  
 165 170 175

Leu Thr Gln Ala Gln Leu Leu Gln Phe Thr Ser Val Val Val Tyr Thr  
 180 185 190

Gly Cys Thr Gly Tyr Thr His Tyr Tyr His Thr Lys His Gly Ala Asp  
 195 200 205

Glu Thr Gln Pro Ser Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Cys Cys Gly Val Gln  
 210 215 220

Val Phe Glu Met Val Ser Leu Phe Val Leu Phe Ser Ile Phe Tyr Lys  
 225 230 235 240

Arg Ser Tyr Ser Lys Lys Asn Lys Ser Gly Gly Lys Asp Ser Lys Lys  
 245 250 255

Asn Asp Asp Gly Asn Asn Glu Asp Gln Cys His Lys Ala Met Lys Asp  
 260 265 270

Ile Ser Glu Gly Ala Lys Glu Val Val Gly His Ala Ala Lys Asp Ala  
 275 280 285

108

aaa atg gac cag gtc tcc ttc ctc cac atc tac cac cac acg acc ata 384  
 Lys Met Asp Gln Val Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Thr Thr Ile  
 115 120 125  
 gcg tgg gca tgg tgg atc gcc ctc cgc ttc tcc ccc ggt gga gac att 432  
 Ala Trp Ala Trp Trp Ile Ala Leu Arg Phe Ser Pro Gly Gly Asp Ile  
 130 135 140  
 tac ttc ggg gca ctc ctc aac tcc atc atc cac gtc ctc atg tat tcc 480  
 Tyr Phe Gly Ala Leu Leu Asn Ser Ile Ile His Val Leu Met Tyr Ser  
 145 150 155 160  
 tac tac gcc ctt gcc cta ctc aag gtc agt tgt cca tgg aaa cga tac 528  
 Tyr Tyr Ala Leu Ala Leu Leu Lys Val Ser Cys Pro Trp Lys Arg Tyr  
 165 170 175  
 ctg act caa gct caa tta ttg caa ttc aca agt gtg gtg gtt tat acg 576  
 Leu Thr Gln Ala Gln Leu Leu Gln Phe Thr Ser Val Val Val Tyr Thr  
 180 185 190  
 ggg tgt acg ggt tat act cat tac tat cat acg aag cat gga gcg gat 624  
 Gly Cys Thr Gly Tyr Thr His Tyr Tyr His Thr Lys His Gly Ala Asp  
 195 200 205  
 gag aca cag cct agt tta gga acg tat tat ttc tgt tgt gga gtg cag 672  
 Glu Thr Gln Pro Ser Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Cys Cys Gly Val Gln  
 210 215 220  
 gtg ttt gag atg gtt agt ttg ttt gta ctc ttt tcc atc ttt tat aaa 720  
 Val Phe Glu Met Val Ser Leu Phe Val Leu Phe Ser Ile Phe Tyr Lys  
 225 230 235 240  
 cga tcc tat tcg aag aag aac aag tca gga gga aag gat agc aag aag 768  
 Arg Ser Tyr Ser Lys Lys Asn Lys Ser Gly Gly Lys Asp Ser Lys Lys  
 245 250 255  
 aat gat gat ggg aat aat gag gat caa tgt cac aag gct atg aag gat 816  
 Asn Asp Asp Gly Asn Asn Glu Asp Gln Cys His Lys Ala Met Lys Asp  
 260 265 270  
 ata tcg gag ggt gcg aag gag gtt gtg ggg cat gca gcg aag gat gct 864  
 Ile Ser Glu Gly Ala Lys Glu Val Val Gly His Ala Ala Lys Asp Ala  
 275 280 285  
 gga aag ttg gtg gct acg gcg agt aag gct gta aag agg aag gga act 912  
 Gly Lys Leu Val Ala Thr Ala Ser Lys Ala Val Lys Arg Lys Gly Thr  
 290 295 300  
 cgt gtt act ggt gcc atg tag 933  
 Arg Val Thr Gly Ala Met  
 305 310

&lt;210&gt; 62

&lt;211&gt; 310

&lt;212&gt; PRT

<213> *Thalassiosira pseudonana*

&lt;400&gt; 62

Met His Ser Tyr Lys Val Pro Leu Gly Leu Thr Val Phe Tyr Leu Leu  
 1 5 10 15

## 107

Arg Ser Tyr Ser Lys Lys Asn Lys Ser Gly Gly Lys Asp Ser Lys Lys  
 290 295 300

Asn Asp Asp Gly Asn Asn Glu Asp Gln Cys His Lys Ala Met Lys Asp  
 305 310 315 320

Ile Ser Glu Gly Ala Lys Glu Val Val Gly His Ala Ala Lys Asp Ala  
 325 330 335

Gly Lys Leu Val Ala Thr Ala Ser Lys Ala Val Lys Arg Lys Gly Thr  
 340 345 350

Arg Val Thr Gly Ala Met  
 355

<210> 61

<211> 933

<212> DNA

<213> *Thalassiosira pseudonana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(933)

<223> Delta-5-Elongase

<400> 61

atg cac tcc tac aaa gtc cca ctc ggt ctc acc gta ttc tac ctg ctg 48  
 Met His Ser Tyr Lys Val Pro Leu Gly Leu Thr Val Phe Tyr Leu Leu  
 1 5 10 15

agt cta ccg tca cta aag tac gtt acg gac aac tac ctt gcc aaa aag 96  
 Ser Leu Pro Ser Leu Lys Tyr Val Thr Asp Asn Tyr Leu Ala Lys Lys  
 20 25 30

tat gat atg aag tca ctc cta acg gaa tca atg gtg ttg tac aat gtg 144  
 Tyr Asp Met Lys Ser Leu Leu Thr Glu Ser Met Val Leu Tyr Asn Val  
 35 40 45

gcg caa gtg ctg ctc aat ggg tgg acg gtg tat gcg att gtg gat gcg 192  
 Ala Gln Val Leu Leu Asn Gly Trp Thr Val Tyr Ala Ile Val Asp Ala  
 50 55 60

gtg atg aat aga gac cat ccg ttt att gga agt aga agt ttg gtt ggg 240  
 Val Met Asn Arg Asp His Pro Phe Ile Gly Ser Arg Ser Leu Val Gly  
 65 70 75 80

gcg gcg ttg cat agt ggg agc tcg tat gcg gtg tgg gtt cat tat tgt 288  
 Ala Ala Leu His Ser Gly Ser Ser Tyr Ala Val Trp Val His Tyr Cys  
 85 90 95

gat aag tat ttg gag ttc ttt gat acg tat ttt atg gtg ttg agg ggg 336  
 Asp Lys Tyr Leu Glu Phe Phe Asp Thr Tyr Phe Met Val Leu Arg Gly  
 100 105 110

## 106

Arg Tyr Thr Thr Ala Ala Leu Leu Leu Leu Thr Leu Thr Thr Trp Cys  
 20 25 30

His Phe Ala Phe Pro Ala Ala Thr Ala Thr Pro Gly Leu Thr Ala Glu  
 35 40 45

Met His Ser Tyr Lys Val Pro Leu Gly Leu Thr Val Phe Tyr Leu Leu  
 50 55 60

Ser Leu Pro Ser Leu Lys Tyr Val Thr Asp Asn Tyr Leu Ala Lys Lys  
 65 70 75 80

Tyr Asp Met Lys Ser Leu Leu Thr Glu Ser Met Val Leu Tyr Asn Val  
 85 90 95

Ala Gln Val Leu Leu Asn Gly Trp Thr Val Tyr Ala Ile Val Asp Ala  
 100 105 110

Val Met Asn Arg Asp His Pro Phe Ile Gly Ser Arg Ser Leu Val Gly  
 115 120 125

Ala Ala Leu His Ser Gly Ser Ser Tyr Ala Val Trp Val His Tyr Cys  
 130 135 140

Asp Lys Tyr Leu Glu Phe Phe Asp Thr Tyr Phe Met Val Leu Arg Gly  
 145 150 155 160

Lys Met Asp Gln Val Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Thr Thr Ile  
 165 170 175

Ala Trp Ala Trp Trp Ile Ala Leu Arg Phe Ser Pro Gly Gly Asp Ile  
 180 185 190

Tyr Phe Gly Ala Leu Leu Asn Ser Ile Ile His Val Leu Met Tyr Ser  
 195 200 205

Tyr Tyr Ala Leu Ala Leu Leu Lys Val Ser Cys Pro Trp Lys Arg Tyr  
 210 215 220

Leu Thr Gln Ala Gln Leu Leu Gln Phe Thr Ser Val Val Val Tyr Thr  
 225 230 235 240

Gly Cys Thr Gly Tyr Thr His Tyr Tyr His Thr Lys His Gly Ala Asp  
 245 250 255

Glu Thr Gln Pro Ser Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Cys Cys Gly Val Gln  
 260 265 270

Val Phe Glu Met Val Ser Leu Phe Val Leu Phe Ser Ile Phe Tyr Lys  
 275 280 285

## 105

Lys Met Asp Gln Val Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Thr Thr Ile  
 165 170 175  
 gcg tgg gca tgg tgg atc gcc ctc cgc ttc tcc ccc ggt gga gac att 576  
 Ala Trp Ala Trp Trp Ile Ala Leu Arg Phe Ser Pro Gly Gly Asp Ile  
 180 185 190  
 tac ttc ggg gca ctc ctc aac tcc atc atc cac gtc ctc atg tat tcc 624  
 Tyr Phe Gly Ala Leu Leu Asn Ser Ile Ile His Val Leu Met Tyr Ser  
 195 200 205  
 tac tac gcc ctt gcc cta ctc aag gtc agt tgt cca tgg aaa cga tac 672  
 Tyr Tyr Ala Leu Ala Leu Leu Lys Val Ser Cys Pro Trp Lys Arg Tyr  
 210 215 220  
 ctg act caa gct caa tta ttg caa ttc aca agt gtg gtg gtt tat acg 720  
 Leu Thr Gln Ala Gln Leu Leu Gln Phe Thr Ser Val Val Val Tyr Thr  
 225 230 235 240  
 ggg tgt acg ggt tat act cat tac tat cat acg aag cat gga gcg gat 768  
 Gly Cys Thr Gly Tyr Thr His Tyr Tyr His Thr Lys His Gly Ala Asp  
 245 250 255  
 gag aca cag cct agt tta gga acg tat tat ttc tgt tgt gga gtg cag 816  
 Glu Thr Gln Pro Ser Leu Gly Thr Tyr Tyr Phe Cys Cys Gly Val Gln  
 260 265 270  
 gtg ttt gag atg gtt agt ttg ttt gta ctc ttt tcc atc ttt tat aaa 864  
 Val Phe Glu Met Val Ser Leu Phe Val Leu Phe Ser Ile Phe Tyr Lys  
 275 280 285  
 cga tcc tat tcg aag aag aac aag tca gga gga aag gat agc aag aag 912  
 Arg Ser Tyr Ser Lys Lys Asn Lys Ser Gly Gly Lys Asp Ser Lys Lys  
 290 295 300  
 aat gat gat ggg aat aat gag gat caa tgt cac aag gct atg aag gat 960  
 Asn Asp Asp Gly Asn Asn Glu Asp Gln Cys His Lys Ala Met Lys Asp  
 305 310 315 320  
 ata tcg gag ggt gcg aag gag gtt gtg ggg cat gca gcg aag gat gct 1008  
 Ile Ser Glu Gly Ala Lys Glu Val Val Gly His Ala Ala Lys Asp Ala  
 325 330 335  
 gga aag ttg gtg gct acg gcg agt aag gct gta aag agg aag gga act 1056  
 Gly Lys Leu Val Ala Thr Ala Ser Lys Ala Val Lys Arg Lys Gly Thr  
 340 345 350  
 cgt gtt act ggt gcc atg tag 1077  
 Arg Val Thr Gly Ala Met  
 355

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 358

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Thalassiosira pseudonana

&lt;400&gt; 60

Met Cys Ser Ser Pro Pro Ser Gln Ser Lys Thr Thr Ser Leu Leu Ala  
 1 5 10 15

Leu Asn Arg Lys Ser Lys Lys Thr  
260

<210> 59

<211> 1077

<212> DNA

<213> *Thalassiosira pseudonana*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1077)

<223> Delta-5-Elongase

<400> 59

atg tgc tca tca ccg ccg tca caa tcc aaa aca aca tcc ctc cta gca 48  
Met Cys Ser Ser Pro Pro Ser Gln Ser Lys Thr Thr Ser Leu Leu Ala  
1 5 10 15

cgg tac acc acc gcc gcc ctc ctc ctc ctc acc ctc aca aca tgg tgc 96  
Arg Tyr Thr Thr Ala Ala Leu Leu Leu Leu Thr Leu Thr Thr Trp Cys  
20 25 30

cac ttc gcc ttc cca gcc gcc acc gcc aca ccc ggc ctc acc gcc gaa 144  
His Phe Ala Phe Pro Ala Ala Thr Ala Thr Pro Gly Leu Thr Ala Glu  
35 40 45

atg cac tcc tac aaa gtc cca ctc ggt ctc acc gta ttc tac ctg ctg 192  
Met His Ser Tyr Lys Val Pro Leu Gly Leu Thr Val Phe Tyr Leu Leu  
50 55 60

agt cta ccg tca cta aag tac gtt acg gac aac tac ctt gcc aaa aag 240  
Ser Leu Pro Ser Leu Lys Tyr Val Thr Asp Asn Tyr Leu Ala Lys Lys  
65 70 75 80

tat gat atg aag tca ctc cta acg gaa tca atg gtg ttg tac aat gtg 288  
Tyr Asp Met Lys Ser Leu Leu Thr Glu Ser Met Val Leu Tyr Asn Val  
85 90 95

gcg caa gtg ctg ctc aat ggg tgg acg gtg tat gcg att gtg gat gcg 336  
Ala Gln Val Leu Leu Asn Gly Trp Thr Val Tyr Ala Ile Val Asp Ala  
100 105 110

gtg atg aat aga gac cat ccg ttt att gga agt aga agt ttg gtt ggg 384  
Val Met Asn Arg Asp His Pro Phe Ile Gly Ser Arg Ser Leu Val Gly  
115 120 125

gcg gcg ttg cat agt ggg agc tcg tat gcg gtg tgg gtt cat tat tgt 432  
Ala Ala Leu His Ser Gly Ser Ser Tyr Ala Val Trp Val His Tyr Cys  
130 135 140

gat aag tat ttg gag ttc ttt gat acg tat ttt atg gtg ttg agg ggg 480  
Asp Lys Tyr Leu Glu Phe Phe Asp Thr Tyr Phe Met Val Leu Arg Gly  
145 150 155 160

aaa atg gac cag gtc tcc ttc ctc cac atc tac cac cac acg acc ata 528



&lt;213&gt; Oncorhynchus mykiss

&lt;400&gt; 58

Met Ala Ser Thr Trp Gln Ser Val Gln Ser Met Arg Gln Trp Ile Leu  
 1 5 10 15

Glu Asn Gly Asp Lys Arg Thr Asp Pro Trp Leu Leu Val Tyr Ser Pro  
 20 25 30

Met Pro Val Ala Ile Ile Phe Leu Leu Tyr Leu Gly Val Val Trp Ala  
 35 40 45

Gly Pro Lys Leu Met Lys Arg Arg Glu Pro Val Asp Leu Lys Ala Val  
 50 55 60

Leu Ile Val Tyr Asn Phe Ala Met Val Cys Leu Ser Val Tyr Met Phe  
 65 70 75 80

His Glu Phe Leu Val Thr Ser Leu Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Leu Cys  
 85 90 95

Gln Pro Val Asp Tyr Ser Thr Ser Pro Leu Ala Met Arg Met Ala Lys  
 100 105 110

Val Cys Trp Trp Phe Phe Phe Ser Lys Val Ile Glu Leu Ala Asp Thr  
 115 120 125

Val Phe Phe Ile Leu Arg Lys Lys Asn Ser Gln Leu Thr Phe Leu His  
 130 135 140

Val Tyr His His Gly Thr Met Ile Phe Asn Trp Trp Ala Gly Val Lys  
 145 150 155 160

Tyr Leu Ala Gly Gly Gln Ser Phe Phe Ile Gly Leu Leu Asn Thr Phe  
 165 170 175

Val His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Gly Leu Ala Ala Leu Gly Pro  
 180 185 190

His Thr Gln Lys Tyr Leu Trp Trp Lys Arg Tyr Leu Thr Ser Leu Gln  
 195 200 205

Leu Leu Gln Phe Val Leu Leu Thr Thr His Thr Gly Tyr Asn Leu Phe  
 210 215 220

Thr Glu Cys Asp Phe Pro Asp Ser Met Asn Ala Val Val Phe Ala Tyr  
 225 230 235 240

Cys Val Ser Leu Ile Ala Leu Phe Ser Asn Phe Tyr Tyr Gln Ser Tyr  
 245 250 255

tatccgatgt gacgctgcag cttctcaatg atattcgaat acgctttgag gagatacagc 4954  
ctaatatccg acaaactggt ttacagatgt acgatcgtae ttgttaccoc tcatagaatt 5014  
ttgaacatcc gaacctggga gttttccctg aaacagatag tatatttgaa cctgtataat 5074  
aatatatagt ctacgcgttt acggaagaca atgtatgtat ttcggttcct ggagaaacta 5134  
ttgcatctat tgcataagga atcttgcacg tgcatacccc ggttcatttt ctgcgtttcc 5194  
atcttgcact tcaatagcat atctttgtta acgaagcatc tgtgcttcat tttgtagaac 5254  
aaaaatgcaa cgcgagagcg ctaatttttc aaacaaagaa tctgagctgc atttttacag 5314  
aacagaaatg caacgcgaaa gcgctatttt accaagcaag aatctgtgct tcatTTTTgt 5374  
aaaacaaaaa tgcaacgcga cgagagcgct aatTTTTcaa acaagaatc tgagctgcat 5434  
ttttacagaa cagaaatgca acgcgagagc gctatTTTtac caacaaagaa tctatacttc 5494  
ttttttgttc tacaaaaatg catccccaga gcgctatTTT tctaacaaag catcttagat 5554  
tactTTTTtt ctcctttgtg cgtctataaa tgcagtctct tgataacttt ttgactgta 5614  
ggtccgttaa ggttagaaga aggtactttt ggtgtctatt ttctcttcca taaaaaagc 5674  
ctgactccac ttcccgctt tactgattac tagcgaagct gcgggtgcat ttttcaaga 5734  
taaaggcatc cccgattata ttctataacc atgtggattg cgcatacttt gtgaacagaa 5794  
agtgatagcg ttgatgattc ttcattggtc agaaaattat gaacggtttc ttctattttg 5854  
tctctatata ctacgtatag gaaatgttta cattttcgta ttgttttcga ttcactctat 5914  
gaatagttct tactacaatt tttttgtcta aagagtaata ctacagataa acataaaaaa 5974  
tgtagaggtc gagtttagat gcaagttcaa ggagcgaaag gtggatgggt aggttatata 6034  
gggatatagc acagagatat atagcaaaga gatacttttg agcaatgttt gtggaagcgg 6094  
tattcgcaat gggaagctcc acccggttg ataactcagaa aagcccaaa aacaggaaga 6154  
ttgtataagc aaatatttaa attgtaaacg ttaatatTTT gttaaaattc gcgttaaatt 6214  
tttgTTaaat cagctcattt tttaacgaat agcccgaat cggcaaaatc ccttataaat 6274  
caaaagaata gaccgagata gggttgagtg ttgttccagt ttccaacaag agtccactat 6334  
taaaagaacgt ggactccaac gtcaaagggc gaaaaagggt ctatcagggc gatggccac 6394  
tacgtgaacc ataccctaa tcaagTTTT tggggtcgag gtgccgtaaa gcagtaaact 6454  
ggaagggtaa acggatgccc ccatttagag ctgacgggg aaagccggcg aacgtggcga 6514  
gaaagggaag gaagaaagcg aaaggagcgg gggctagggc ggtgggaagt gtaggggtca 6574  
cgctgggcgt aaccaccaca cccgcgcgc ttaatggggc gctacagggc gcgtggggat 6634  
gatccactag t 6645

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 264

&lt;212&gt; PRT

tggtcctgca actttatccg cctccattca gtctattaat tgttgccggg aagctagagt 2914  
aagtagttcg ccagttaata gtttgcgcaa cgttggtggc attgctacag gcatcgtggg 2974  
gtcactctcg tcgtttggta tggcttcatt cagctccggg tcccaacgat caaggcgagt 3034  
tacatgatcc cccatgttgt gcaaaaaagc ggtagctcc ttcggtcctc cgatcgttgt 3094  
cagaagtaag ttggccgcag tggttatcact catggttatg gcagcactgc ataattctct 3154  
tactgtcatg ccatccgtaa gatgcttttc tgtgactggg gagtactcaa ccaagtcatt 3214  
ctgagaatag tgtatgcggc gaccgagttg ctcttgcccg gcgtcaatac gggataatag 3274  
tgtatcacat agcagaactt taaaagtgt catcattgga aaacgttctt cggggcgaaa 3334  
actctcaagg atcttaccgc tgttgagatc cagttcgatg taaccctcctc gtgcacccaa 3394  
ctgatcttca gcatctttta ctttcaccag cgtttctggg tgagcaaaaa caggaaggca 3454  
aaatgccgca aaaaagggaa taagggcgac acggaaatgt tgaatactca tactcttctt 3514  
ttttcaatgg gtaataactg atataattaa attgaagctc taatttgtga gtttagtata 3574  
catgcattta cttataatac agtttttttag ttttgctggc cgcattcttct caaatatgct 3634  
tcccagcctg cttttctgta acgttcaccc tctaccttag catcccttcc ctttgcaaat 3694  
agtcctcttc caacaataat aatgtcagat cctgtagaga ccacatcatc cacggttcta 3754  
tactgttgac ccaatgcgtc tcccttgta tctaaaccca caccgggtgt cataatcaac 3814  
caatcgtaac cttcatctct tccaccatg tctctttgag caataaagcc gataacaaaa 3874  
tctttgtcgc tcttcgcaat gtcaacagta cccttagtat attctccagt agatagggag 3934  
cccttgcatg acaattctgc taacatcaaa aggcctctag gttcctttgt tacttcttct 3994  
gccgcctgct tcaaaccgct aacaatacct gggcccacca caccgtgtgc attcgtaatg 4054  
tctgcccatt ctgtattctt gtataacccc gcagagtact gcaatttgac tgtattacca 4114  
atgtcagcaa attttctgtc ttcgaagagt aaaaaattgt acttggcgga taatgccttt 4174  
agcggcttaa ctgtgcctc catggaaaaa tcagtcaaga tatccacatg tgttttttagt 4234  
aaacaaatth ttggaccta tgcttcaact aactccagta attccttggg ggtacgaaca 4294  
tccaatgaag cacacaagtt tgtttgcttt tcgtgcatga tattaatag cttggcagca 4354  
acaggactag gatgagtagc agcacgttcc ttatatgtag ctttcgacat gatttatctt 4414  
cgtttcctgc aggtttttgt tctgtgcagt tgggttaaga atactgggca atttcatgtt 4474  
tcttcaacac tacatatgcg tatatatacc aatctaagtc tgtgctcctt ccttcgttct 4534  
tccttctgtt cggagattac cgaatcaaaa aaatttcaaa gaaaccgaaa tcaaaaaaaaa 4594  
gaataaaaaa aaaaatgatga attgaattga aaagctagct tatcgatgat aagctgtcaa 4654  
agatgagaat taattccacg gactatagac tatactagat actccgtcta ctgtacgata 4714  
cacttccgct caggctcttg tctttaacg aggccttacc actcttttgt tactctattg 4774  
atccagctca gcaaaggcag tgtgatctaa gattctatct tcgcatgta gtaaaactag 4834  
ctagaccgag aaagagacta gaaatgcaaa aggcacttct acaatggctg ccatcattat 4894

100

Trp Lys Arg Tyr Leu Thr Ser Leu Gln Leu Leu Gln Phe Val Leu Leu  
 200 205 210 215  
 acc act cac act ggc tac aac ctc ttc act gag tgt gac ttc ccg gac 1205  
 Thr Thr His Thr Gly Tyr Asn Leu Phe Thr Glu Cys Asp Phe Pro Asp 230  
 220  
 tcc atg aac gct gtg gtg ttt gcc tac tgt gtc agt ctc att gct ctc 1253  
 Ser Met Asn Ala Val Val Phe Ala Tyr Cys Val Ser Leu Ile Ala Leu 245  
 235 240  
 ttc agc aac ttc tac tat cag agc tac ctc aac agg aag agc aag aag 1301  
 Phe Ser Asn Phe Tyr Tyr Gln Ser Tyr Leu Asn Arg Lys Ser Lys Lys 260  
 250 255  
 aca taaggatcca ctagtaacgg ccgccagtgt gctggaattc tgcagatata 1354  
 Thr  
 catcacactg gcggccgctc gagcatgcat ctagagggcc gcatcatgta attagttatg 1414  
 tcacgcttac attcacgccc tccccccaca tccgctctaa ccgaaaagga aggagttaga 1474  
 caacctgaag tctaggtccc tatttatttt tttatagtta tgtagtatt aagaacgtta 1534  
 tttatatttc aaatttttct tttttttotg tacagacgcg tgtacgcatg taacattata 1594  
 ctgaaaacct tgcttgagaa ggttttggga cgctcgaaagg ctttaatttg cggccctgca 1654  
 ttaatgaatc ggccaacgcg cggggagagg cggtttgcgt attgggcgct cttccgcttc 1714  
 ctcgctcact gactcgctgc gctcggtcgt tcggctgcgg cgagcgggtat cagctcactc 1774  
 aaaggcggta atacgggttat ccacagaatc aggggataac gcaggaaaga acatgtgagc 1834  
 aaaaggccag caaaagccca ggaaccgtaa aaaggccgcg ttgctggcgt tttccatag 1894  
 gctccgcccc cctgacgagc atcacaaaaa tcgacgctca agtcagaggt ggcgaaaccc 1954  
 gacaggacta taaagatacc aggcgtttcc ccctggaagc tccctcgtgc gctctcctgt 2014  
 tccgacctg ccgcttacog gatacctgtc cgcctttctc ccttcgggaa gcgtggcgct 2074  
 ttctcatagc tcacgctgta ggtatctcag ttcgggtgtag gtcgttcgct ccaagctggg 2134  
 ctgtgtgcac gaaccccccg ttcagcccgga ccgctgcgcc ttatccggta actatcgtct 2194  
 tgagtccaac ccggaagac acgacttata gccactggca gcagccactg gtaacaggat 2254  
 tagcagagcg aggtatgtag gcggtgctac agagttcttg aagtgggtggc ctaactacgg 2314  
 ctacactaga aggacagtat ttggtatctg cgctctgctg aagccagtta ccttcggaaa 2374  
 aagagttggg agctcttgat ccggcaaaaa aaccaccgct ggtagcggtg gtttttttgt 2434  
 ttgcaagcag cagattacgc gcagaaaaaa aggatctcaa gaagatcctt tgatcttttc 2494  
 tacgggggtct gacgctcagt ggaacgaaaa ctcacgttaa gggatttttg tcatgagatt 2554  
 atcaaaaagg atcttcacct agatcctttt aaattaaaaa tgaagtttta aatcaatcta 2614  
 aagtatatat gagtaaaactt ggtctgacag ttaccaatgc ttaatcagtg aggcacctat 2674  
 ctcagcgatc tgtctatttc gttcatccat agttgcctga ctccccgtcg tgtagataac 2734  
 tacgatacgg gagcgcttac catctggccc cagtgcgtgca atgataccgc gagaccacg 2794  
 ctcaccggct ccagatttat cagcaataaa ccagccagcc ggaagggccg agcgcagaag 2854

cctcgtcctc accggtcgcg ttcctgaaac gcagatgtgc ctgcgcgcgc actgctccga	120
acaataaaga ttctacaata ctagctttta tgggttatgaa gaggaanaat tggcagtaac	180
ctggccccac aaaccttcaa atgaacgaat caaattaaca accataggat gataatgcga	240
ttagtttttt agccttattt ctggggtaat taatcagcga agcgaatgatt tttgatctat	300
taacagatat ataaatgcaa aaactgcatt aaccacttta actaatactt tcaacatttt	360
cggtttgat tacttcttat tcaaatgtaa taaaagtatc aacaaaaaat tgtaataata	420
cctctatact ttaacgtcaa ggagaaaaaa ccccggaatcg gactactagc agctgtaata	480
cgactcacta tagggaatat taagcttaca ta atg gct tca aca tgg caa agc	533
Met Ala Ser Thr Trp Gln Ser	
1 5	
ggt cag tcc atg cgc cag tgg att tta gag aat gga gat aaa agg aca	581
Val Gln Ser Met Arg Gln Trp Ile Leu Glu Asn Gly Asp Lys Arg Thr	
10 15 20	
gac cca tgg cta ctg gtc tac tcc cct atg cca gtg gcc att ata ttc	629
Asp Pro Trp Leu Leu Val Tyr Ser Pro Met Pro Val Ala Ile Ile Phe	
25 30 35	
ctc ctc tat ctt ggt gtg gtc tgg gct ggg ccc aag ctg atg aaa cgc	677
Leu Leu Tyr Leu Gly Val Val Trp Ala Gly Pro Lys Leu Met Lys Arg	
40 45 50 55	
agg gaa cca gtt gat ctc aag gct gta ctc att gtc tac aac ttc gcc	725
Arg Glu Pro Val Asp Leu Lys Ala Val Leu Ile Val Tyr Asn Phe Ala	
60 65 70	
atg gtc tgc ctg tct gtc tac atg ttc cat gag ttc ttg gtc acg tcc	773
Met Val Cys Leu Ser Val Tyr Met Phe His Glu Phe Leu Val Thr Ser	
75 80 85	
ttg ctg tct aac tac agt tac ctg tgt caa cct gtg gat tac agc act	821
Leu Leu Ser Asn Tyr Ser Tyr Leu Cys Gln Pro Val Asp Tyr Ser Thr	
90 95 100	
agt cca ctg gcg atg agg atg gcc aaa gta tgc tgg tgg ttt ttc ttc	869
Ser Pro Leu Ala Met Arg Met Ala Lys Val Cys Trp Trp Phe Phe Phe	
105 110 115	
tcc aag gtc ata gaa ttg gct gac acg gtg ttc ttc atc ctg agg aag	917
Ser Lys Val Ile Glu Leu Ala Asp Thr Val Phe Phe Ile Leu Arg Lys	
120 125 130 135	
aag aac agt cag ctg act ttc ctg cat gtc tat cac cat ggc acc atg	965
Lys Asn Ser Gln Leu Thr Phe Leu His Val Tyr His His Gly Thr Met	
140 145 150	
atc ttc aac tgg tgg gca ggg gtc aag tat ctg gct gga ggc caa tgc	1013
Ile Phe Asn Trp Trp Ala Gly Val Lys Tyr Leu Ala Gly Gly Gln Ser	
155 160 165	
ttc ttc atc ggc ctg ctc aat acc ttt gtg cac atc gtg atg tac tct	1061
Phe Phe Ile Gly Leu Leu Asn Thr Phe Val His Ile Val Met Tyr Ser	
170 175 180	
tac tac gga ctg gct gcc ctg ggg cct cac acg cag aag tac tta tgg	1109
Tyr Tyr Gly Leu Ala Ala Leu Gly Pro His Thr Gln Lys Tyr Leu Trp	
185 190 195	
tgg aag cgc tat ctg acc tca ctg cag ctg ctc cag ttt gtc ctg ttg	1157

Phe Phe Ile Leu Arg Lys Asn Asn His Gln Ile Thr Phe Leu His Ile  
 130 135 140

Tyr His His Ala Ser Met Leu Asn Ile Trp Trp Phe Val Met Asn Trp  
 145 150 155 160

Val Pro Cys Gly His Ser Tyr Phe Gly Ala Ser Leu Asn Ser Phe Ile  
 165 170 175

His Val Leu Met Tyr Ser Tyr Tyr Gly Leu Ser Ala Val Pro Ala Leu  
 180 185 190

Arg Pro Tyr Leu Trp Trp Lys Lys Tyr Ile Thr Gln Val Gln Leu Ile  
 195 200 205

Gln Phe Phe Leu Thr Met Ser Gln Thr Ile Cys Ala Val Ile Trp Pro  
 210 215 220

Cys Asp Phe Pro Arg Gly Trp Leu Tyr Phe Gln Ile Phe Tyr Val Ile  
 225 230 235 240

Thr Leu Ile Ala Leu Phe Ser Asn Phe Tyr Ile Gln Thr Tyr Lys Lys  
 245 250 255

His Leu Val Ser Gln Lys Lys Glu Tyr His Gln Asn Gly Ser Val Ala  
 260 265 270

Ser Leu Asn Gly His Val Asn Gly Val Thr Pro Thr Glu Thr Ile Thr  
 275 280 285

His Arg Lys Val Arg Gly Asp  
 290 295

<210> 57

<211> 6645

<212> DNA

<213> Oncorhynchus mykiss

<220>

<221> CDS

<222> (513)..(1304)

<223> Delta-5-Elongase

<400> 57

acggattaga agccgccgag cgggtgacag ccctccgaag gaagactctc ctccgtgcgt

60

. aaaaatgtag aggtcgagtt tagatgcaag ttcaaggagc gaaaggtgga tgggtagggtt 6137  
 atatagggat atagcacaga gatatatagc aaagagatac ttttgagcaa tgtttgtgga 6197  
 agcgggtattc gcaatgggaa gctccacccc gggtgataat cagaaaagcc ccaaaaacag 6257  
 gaagattgta taagcaaata tttaaattgt aaacgttaat attttgtaa aattcgcggtt 6317  
 aaatttttgt taaatcagct ctttttttaa cgaatagccc gaaatcggca aaatccctta 6377  
 taaatcaaaa gaatagaccg agataggggtt gagtgttggt ccagtttcca acaagagtcc 6437  
 actattaaag aacgtggact ccaacgtcaa agggcgaaaa aggggtctatc agggcgatgg 6497  
 cccactacgt gaaccatcac cctaatcaag ttttttgggg tcgaggtgcc gtaaagcagt 6557  
 aaatcggaag ggtaaacgga tgccccatt tagagcttga cggggaaaagc cggcgaaactg 6617  
 ggcgagaaaag gaagggaaga aagcgaaaag agcgggggct agggcggtgg gaagtgtagg 6677  
 ggtcacgctg ggcgtaacca ccacaccgc cgcgcttaat ggggcgctac agggcgcggtg 6737  
 gggatgatcc actagt 6753

<210> 56

<211> 295

<212> PRT

<213> *Oncorhynchus mykiss*

<400> 56

Met Glu Thr Phe Asn Tyr Lys Leu Asn Met Tyr Ile Asp Ser Trp Met  
1 5 10 15

Gly Pro Arg Asp Glu Arg Val Gln Gly Trp Leu Leu Leu Asp Asn Tyr  
20 25 30

Pro Pro Thr Phe Ala Leu Thr Val Met Tyr Leu Leu Ile Val Trp Met  
35 40 45

Gly Pro Lys Tyr Met Arg His Arg Gln Pro Val Ser Cys Arg Gly Leu  
50 55 60

Leu Leu Val Tyr Asn Leu Gly Leu Thr Ile Leu Ser Phe Tyr Met Phe  
65 70 75 80

Tyr Glu Met Val Ser Ala Val Trp His Gly Asp Tyr Asn Phe Phe Cys  
85 90 95

Gln Asp Thr His Ser Ala Gly Glu Thr Asp Thr Lys Ile Ile Asn Val  
100 105 110

Leu Trp Trp Tyr Tyr Phe Ser Lys Leu Ile Glu Phe Met Asp Thr Phe  
115 120 125

gtagttctg tccattggtg aaagtttgcg gcttgccagag cacagaggcc gcagaatgtg 4097  
ctctagattc cgatgctgac ttgctgggta ttatatgtgt gccaataga aagagaacaa 4157  
ttgacccggt tattgcaagg aaaatttcaa gtcttgtaaa agcatataaa aatagttcag 4217  
gcactccgaa atacttggtt ggcgtgtttc gtaatcaacc taaggaggat gttttggctc 4277  
tgggtcaatga ttacggcatt gatatcgctc aactgcacgg agatgagtcg tggcaagaat 4337  
accaagagtt cctcggtttg ccagttatta aaagactcgt atttccaaaa gactgcaaca 4397  
tactactcag tgcagcttca cagaaacctc attcgtttat tcccttgttt gattcagaag 4457  
caggtgggac aggtgaactt ttggattgga actcgatttc tgactggggtt ggaaggcaag 4517  
agagccccga gagcttacat tttatgttag ctgggtggact gacgccagaa aatgttggtg 4577  
atgcgcttag attaaatggc gttattgggtg ttgatgtaag cggagggtgtg gagacaaatg 4637  
gtgtaaaaga ctctaacaaa atagcaaatt tcgtcaaaaa tgctaagaaa taggttatta 4697  
ctgagtagta tttatttaag tattgtttgt gcacttgccc tagcttatcg atgataagct 4757  
gtcaaagatg agaattaatt ccacggacta tagactatac tagatactcc gtctactgta 4817  
cgatacactt ccgctcaggt ccttgctcct taacgaggcc ttaccactct tttgttactc 4877  
tattgatcca gctcagcaaa ggcagtgtga tctaagattc tatcttcgcg atgtagtaaa 4937  
actagctaga ccgagaaaga gactagaaat gcaaaaggca cttctacaat ggctgccatc 4997  
attattatcc gatgtgacgc tgcagcttct caatgatatt cgaatacgtt ttgaggagat 5057  
acagcctaatt atccgacaaa ctgttttaca gatttacgat cgtacttggt acccatcatt 5117  
gaattttgaa catccgaacc tgggagtttt ccctgaaaca gatagtatat ttgaacctgt 5177  
ataataatat atagtctagc gctttacgga agacaatgta tgtatttcgg ttcttgaga 5237  
aactattgca tctattgcat aggtaatctt gcacgtcgca tccccggttc attttctgcg 5297  
tttccatctt gcacttcaat agcatatctt tgtaaacgaa gcatctgtgc ttcattttgt 5357  
agaacaaaaa tgcaacgcga gagcgctaatt ttttcaaaca aagaatctga gctgcatttt 5417  
tacagaacag aaatgcaacg cgaaagcgct atttttacca cgaagaatct gtgcttcatt 5477  
tttgtaaaac aaaaatgcaa cgcgacgaga gcgctaattt ttcaaacaaa gaatctgagc 5537  
tgcattttta cagaacagaa atgcaacgcg agagcgctat tttaacca aagaatctat 5597  
acttcttttt tgttctacaa aaatgcatcc cgagagcgct atttttctaa caaagcatct 5657  
tagattactt tttttctcct ttgtgcgctc tataatgcag tctcttgata actttttgca 5717  
ctgtaggtcc gttaagggtta gaagaaggct actttggtgt ctattttctc ttccataaaa 5777  
aaagcctgac tccacttccc gcgtttactg attactagcg aagctgcggg tgcatttttt 5837  
caagataaag gcatccccga ttatattcta taccgatgtg gattgcgcat actttgtgaa 5897  
cagaaagtga tagcgttgat gattcttcat tggtcagaaa attatgaacg gtttcttcta 5957  
ttttgtctct atatactacg tataggaaat gtttacattt tcgtattgtt ttcgattcac 6017  
tctatgaata gttcttacta caattttttt gtctaaagag taatactaga gataaacata 6077



acagaatcag gggataacgc aggaaagaac atgtgagcaa aaggccagca aaagcccagg	2057
aaccgtaaaa aggcgcggtt gctggcggtt ttccataggc tccgcccccc tgacgagcat	2117
cacaaaaatc gacgctcaag tcagaggtgg cgaaacccga caggactata aagataccag	2177
gcggttcccc ctggaagctc cctcgtgcgc tctcctgttc cgaccctgcc gcttaccgga	2237
tacctgtccg cctttctccc ttcggaagc gtggcggtt ctcatagctc acgctgtagg	2297
tatctcagtt cgggtgtaggt cgttcgtcc aagctgggt gtgtgcacga acccccgtt	2357
cagcccgacc gctgcgcctt atccggtaac tatcgtcttg agtccaaccc ggtaagacac	2417
gacttatcgc cactggcagc agccactggt aacaggatta gcagagcgag gtatgtaggc	2477
ggtgctacag agttcttgaa gtgggtggcct aactacggct aactagaag gacagtattt	2537
ggtatctgcg ctctgtgaa gccagttacc ttcggaaaaa gagttgtag ctcttgatcc	2597
ggcaaacaaa ccaccgctgg tagcgggtgt tttttgttt gcaagcagca gattacgcgc	2657
agaaaaaaag gatctcaaga agatcctttg atcttttcta cggggtctga cgctcagtg	2717
aacgaaaact cacgttaagg gattttggct atgagattat caaaaaggat cttcacctag	2777
atccttttaa attaaaaatg aagttttaa tcaatctaaa gtatatatga gtaaacttg	2837
tctgacagtt accaatgctt aatcagtgag gcacctatct cagcgatctg tctatttctg	2897
tcatccatag ttgcctgact ccccgctgtg tagataacta cgatacggga gcgcttacca	2957
tctggcccca gtgctgcaat gataccgcga gaccacgct caccggctcc agatttatca	3017
gcaataaacc agccagccgg aagggccgag cgcagaagtg gtccctgcaac tttatccgcc	3077
tccatccagt ctattaattg ttgcccggaa gctagagtaa gtagttcgcc agttaatagt	3137
ttgcgcaacg ttgttgccat tgctacaggc atcgtggtgt cacgctcgtc gtttggtatg	3197
gcttcattca gtcgcggttc ccaacgatca aggcgagtta catgatcccc catgttggtgc	3257
aaaaaagcgg ttagctcctt cggtcctccg atcgttgta gaagtaagtt ggccgcagtg	3317
ttatcactca tggttatggc agcactgcat aattctctta ctgtcatgcc atccgtaaga	3377
tgcttttctg tgactgggtg gtactcaacc aagtcattct gagaatagtg tatgcggcga	3437
ccgagttgct cttgcccggc gtcaacacgg gataataccg cgccacatag cagaacttta	3497
aaagtgtca tcattggaaa acgttcttcg gggcgaaaac tctcaaggat cttaccgctg	3557
ttgagatcca gttcgatgta acccactcgt gcacccaact gatcttcagc atcttttact	3617
ttcaccagcg tttctgggtg agcaaaaaca ggaaggcaaa atgccgcaaa aaagggaata	3677
agggcgacac ggaaatgttg aatactcata ctcttccttt ttcaatatta ttgaagcatt	3737
tatcagggtt attgtctcat gagcggatac atatttgaat gtatttagaa aaataaaca	3797
ataggggttc cgcgcacatt tccccgaaa gtgccacctg acgtctaaga aaccattatt	3857
atcatgacat taacctataa aaataggcgt atcacgaggc cctttcgtct tcaagaaatt	3917
cggtcgaaaa aagaaaagga gagggccaag agggaggga ttggtgacta ttgagcacgt	3977
gagtatacgt gattaagcac acaaaggcag cttggagtat gtctgttatt aatttcacag	4037

gaa acc gat acc aag atc ata aat gtg ctg tgg tgg tac tac ttc tcc 869  
 Glu Thr Asp Thr Lys Ile Ile Asn Val Leu Trp Trp Tyr Tyr Phe Ser  
 105 110 115  
 aag ctc ata gag ttt atg gat acc ttc ttc ttc atc ctg cgg aag aac 917  
 Lys Leu Ile Glu Phe Met Asp Thr Phe Phe Phe Ile Leu Arg Lys Asn  
 120 125 130 135  
 aac cat caa atc acg ttt ctg cac atc tac cac cat gct agc atg ctc 965  
 Asn His Gln Ile Thr Phe Leu His Ile Tyr His His Ala Ser Met Leu  
 140 145 150  
 aac atc tgg tgg ttc gtc atg aac tgg gtg ccc tgt ggt cac tcc tac 1013  
 Asn Ile Trp Trp Phe Val Met Asn Trp Val Pro Cys Gly His Ser Tyr  
 155 160 165  
 ttt ggt gcc tcc ctg aac agc ttc atc cat gtc ctg atg tac tct tac 1061  
 Phe Gly Ala Ser Leu Asn Ser Phe Ile His Val Leu Met Tyr Ser Tyr  
 170 175 180  
 tat ggg ctc tct gct gtc ccg gcc ttg cgg ccc tat cta tgg tgg aag 1109  
 Tyr Gly Leu Ser Ala Val Pro Ala Leu Arg Pro Tyr Leu Trp Trp Lys  
 185 190 195  
 aaa tac atc aca caa gta cag ctg att cag ttc ttt ttg acc atg tcc 1157  
 Lys Tyr Ile Thr Gln Val Gln Leu Ile Gln Phe Phe Leu Thr Met Ser  
 200 205 210 215  
 cag acg ata tgt gca gtc att tgg cca tgt gat ttc ccc aga ggg tgg 1205  
 Gln Thr Ile Cys Ala Val Ile Trp Pro Cys Asp Phe Pro Arg Gly Trp  
 220 225 230  
 ctg tat ttc cag ata ttc tat gtc atc aca ctt att gcc ctt ttc tca 1253  
 Leu Tyr Phe Gln Ile Phe Tyr Val Ile Thr Leu Ile Ala Leu Phe Ser  
 235 240 245  
 aac ttc tac att cag act tac aag aaa cac ctt gtt tca caa aag aag 1301  
 Asn Phe Tyr Ile Gln Thr Tyr Lys Lys His Leu Val Ser Gln Lys Lys  
 250 255 260  
 gag tat cat cag aat ggc tct gtt gct tca ttg aat ggc cat gtg aat 1349  
 Glu Tyr His Gln Asn Gly Ser Val Ala Ser Leu Asn Gly His Val Asn  
 265 270 275  
 ggg gtg aca ccc acg gaa acc att aca cac agg aaa gtg agg ggg gac 1397  
 Gly Val Thr Pro Thr Glu Thr Ile Thr His Arg Lys Val Arg Gly Asp  
 280 285 290 295  
 tgaaggatcc actagtaacg gccgccagtg tgctggaatt ctgcagatat ccagcacagt 1457  
 gccggccgct cgagtctaga gggcccttcg aaggtaagcc tatccctaac cctctcctcg 1517  
 gtctcgattc tacgcgtacc ggtcatcatc accatcacca ttgagtttaa acccgctgat 1577  
 cctagagggc cgcacatgt aattagttat gtcacgctta cattcacgcc ctccccccac 1637  
 atccgctcta accgaaaagg aaggagttag acaacctgaa gtctaggtcc ctatttattt 1697  
 ttttatagtt atgttagtat taagaacggt atttatatattt caaatttttc tttttttct 1757  
 gtacagacgc gtgtacgcat gtaacattat actgaaaacc ttgcttgaga aggttttggg 1817  
 acgctcgaag gctttaattt gcaagctgcg gccctgcatt aatgaatcgg ccaacgcgcg 1877  
 gggagaggcg gtttgcttat tggcgctct tccgcttccg cgctcactga ctgcgtgcgc 1937  
 tcggtcgttc ggctgcggcg agcggtatca gctcactcaa aggcggtaat acggttatcc 1997

## 200

His Val Tyr His His Ser Thr Met Pro Leu Leu Trp Trp Ile Gly Ala  
 145 150 155 160

Lys Trp Val Pro Gly Gly Gln Ser Phe Val Gly Ile Ile Leu Asn Ser  
 165 170 175

Ser Val His Val Ile Met Tyr Thr Tyr Tyr Gly Leu Ser Ala Leu Gly  
 180 185 190

Pro His Met Gln Lys Phe Leu Trp Trp Lys Lys Tyr Ile Thr Met Leu  
 195 200 205

Gln Leu Val Gln Phe Val Leu Ala Ile Tyr His Thr Ala Arg Ser Leu  
 210 215 220

Tyr Val Lys Cys Pro Ser Pro Val Trp Met His Trp Ala Leu Ile Leu  
 225 230 235 240

Tyr Ala Phe Ser Phe Ile Leu Leu Phe Ser Asn Phe Tyr Met His Ala  
 245 250 255

Tyr Ile Lys Lys Ser Arg Lys Gly Lys Glu Asn Gly Ser Arg Gly Lys  
 260 265 270

Gly Gly Val Ser Asn Gly Lys Glu Lys Leu His Ala Asn Gly Lys Thr  
 275 280 285

Asp

<210> 121

<211> 30

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 121  
 aggatccatg gccttcaagg agctcacatc

30

<210> 122

<211> 35

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(35)

<223>

<400> 122

cctcgagtca atggtttttg cttttcaatg caccg

35

<210> 123

<211> 25

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 123

taagcttatg gacgtacttc atcgt

25

<210> 124

<211> 26

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 124

tcagatcttt aatcggtttt accatt

26

<210> 125

<211> 34

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(34)

<223>

<400> 125

gcggccgcac catggccttc aaggagctca catc

34

<210> 126

<211> 38

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(38)

<223>

<400> 126

gcggccgcct tcaatgggtt ttgcttttca atgcaccg

38

<210> 127

<211> 29

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(29)

<223>

203

<400> 127  
gcggccgcac catggacgta cttcatcgt

29

<210> 128

<211> 27

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(27)

<223>

<400> 128  
gcggccgctt taatcggttt taccatt

27

<210> 129

<211> 60

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(60)

<223>

<400> 129  
gtcgacccgc ggactagtgg gccctctaga cccgggggat ccggatctgc tggctatgaa 60

<210> 130

<211> 60

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(60)

&lt;223&gt;

<400> 130  
gtcgacccgc ggactagtgg gccctctaga cccgggggat ccg gatctgc tggctatgaa 60

&lt;210&gt; 131

&lt;211&gt; 789

&lt;212&gt; DNA

<213> *Euglena gracilis*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(789)

&lt;223&gt; Delta-5-Elongase

<400> 131  
atg ctg ggg gcc atc gcg gac gtc gtg ctc cgg ggg ccc gcc gca ttc 48  
Met Leu Gly Ala Ile Ala Asp Val Val Leu Arg Gly Pro Ala Ala Phe  
1 5 10 15

cac tgg gac cct gcc acc acc ccg ctc gca tgc atc gtc agc ccc tgt 96  
His Trp Asp Pro Ala Thr Thr Pro Leu Ala Ser Ile Val Ser Pro Cys  
20 25 30

gtg gcc tcc gtg gcg tac ctg ggg gcc atc ggg ctg ctg aag cgc cgc 144  
Val Ala Ser Val Ala Tyr Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Lys Arg Arg  
35 40 45

act gga ccg gag gtc cgc tcc aag ccc ttc gag ctg cta cac aac ggg 192  
Thr Gly Pro Glu Val Arg Ser Lys Pro Phe Glu Leu Leu His Asn Gly  
50 55 60

ctg ctg gtg ggc tgg tcc ctc gtg gtg ctg ctc ggg acg ctg tac ggc 240  
Leu Leu Val Gly Trp Ser Leu Val Val Leu Leu Gly Thr Leu Tyr Gly  
65 70 75 80

gcg ttc cag cgc gtg cag gag gac ggc cgg ggg gtg cag gcc ctc ctg 288  
Ala Phe Gln Arg Val Gln Glu Asp Gly Arg Gly Val Gln Ala Leu Leu  
85 90 95

tgc acc cag cgg cca cca tct cag atc tgg gac ggc ccg gtg ggg tac 336  
Cys Thr Gln Arg Pro Pro Ser Gln Ile Trp Asp Gly Pro Val Gly Tyr  
100 105 110

ttc acg tac ctc ttc tac ctc gcg aag tac tgg gag ctg gcg gac act 384  
Phe Thr Tyr Leu Phe Tyr Leu Ala Lys Tyr Trp Glu Leu Ala Asp Thr  
115 120 125

gtc atc ctc gcc ctc cgc cag aag ccc acc atc ccc ctc cac gtc tac 432  
Val Ile Leu Ala Leu Arg Gln Lys Pro Thr Ile Pro Leu His Val Tyr  
130 135 140

cat cac gcc gtc atg ctg ttc atc gtg tgg tgc tgg ttc gcg cac ccc 480  
His His Ala Val Met Leu Phe Ile Val Trp Ser Trp Phe Ala His Pro  
145 150 155 160

## 205

tgg ctc gag ggg agc tgg tgg tgc tcc ctg gtc aac tct ttc atc cac 528  
 Trp Leu Glu Gly Ser Trp Trp Cys Ser Leu Val Asn Ser Phe Ile His  
 165 170 175  
 acg gtg atg tac tcg tac tac acc ctg acg gtg gtt ggc atc aac cct 576  
 Thr Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Thr Leu Thr Val Val Gly Ile Asn Pro  
 180 185 190  
 tgg tgg aag aag tgg atg acc acc atg cag atc atc cag ttc atc acg 624  
 Trp Trp Lys Lys Trp Met Thr Thr Met Gln Ile Ile Gln Phe Ile Thr  
 195 200 205  
 ggc tgc gtg tac gtc atg gcg ttc ttc ggc cta tat tat gcc ggg gcg 672  
 Gly Cys Val Tyr Val Met Ala Phe Phe Gly Leu Tyr Tyr Ala Gly Ala  
 210 215 220  
 ggc tgc acc tcc aac gtg tac act gcc tgg ttc tcg atg ggg gtc aac 720  
 Gly Cys Thr Ser Asn Val Tyr Thr Ala Trp Phe Ser Met Gly Val Asn  
 225 230 235 240  
 ctc agc ttt ctg tgg ctc ttc gct ctt ttc ttc cgc cgg tca tac agc 768  
 Leu Ser Phe Leu Trp Leu Phe Ala Leu Phe Phe Arg Arg Ser Tyr Ser  
 245 250 255  
 aaa cct agc cgg aag gag tag 789  
 Lys Pro Ser Arg Lys Glu  
 260

&lt;210&gt; 132

&lt;211&gt; 262

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Euglena gracilis

&lt;400&gt; 132

Met Leu Gly Ala Ile Ala Asp Val Val Leu Arg Gly Pro Ala Ala Phe  
 1 5 10 15  
 His Trp Asp Pro Ala Thr Thr Pro Leu Ala Ser Ile Val Ser Pro Cys  
 20 25 30  
 Val Ala Ser Val Ala Tyr Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Lys Arg Arg  
 35 40 45  
 Thr Gly Pro Glu Val Arg Ser Lys Pro Phe Glu Leu Leu His Asn Gly  
 50 55 60  
 Leu Leu Val Gly Trp Ser Leu Val Val Leu Leu Gly Thr Leu Tyr Gly  
 65 70 75 80  
 Ala Phe Gln Arg Val Gln Glu Asp Gly Arg Gly Val Gln Ala Leu Leu  
 85 90 95  
 Cys Thr Gln Arg Pro Pro Ser Gln Ile Trp Asp Gly Pro Val Gly Tyr  
 100 105 110



Phe Thr Tyr Leu Phe Tyr Leu Ala Lys Tyr Trp Glu Leu Ala Asp Thr  
 115 120 125

Val Ile Leu Ala Leu Arg Gln Lys Pro Thr Ile Pro Leu His Val Tyr  
 130 135 140

His His Ala Val Met Leu Phe Ile Val Trp Ser Trp Phe Ala His Pro  
 145 150 155 160

Trp Leu Glu Gly Ser Trp Trp Cys Ser Leu Val Asn Ser Phe Ile His  
 165 170 175

Thr Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Thr Leu Thr Val Val Gly Ile Asn Pro  
 180 185 190

Trp Trp Lys Lys Trp Met Thr Thr Met Gln Ile Ile Gln Phe Ile Thr  
 195 200 205

Gly Cys Val Tyr Val Met Ala Phe Phe Gly Leu Tyr Tyr Ala Gly Ala  
 210 215 220

Gly Cys Thr Ser Asn Val Tyr Thr Ala Trp Phe Ser Met Gly Val Asn  
 225 230 235 240

Leu Ser Phe Leu Trp Leu Phe Ala Leu Phe Phe Arg Arg Ser Tyr Ser  
 245 250 255

Lys Pro Ser Arg Lys Glu  
 260

<210> 133

<211> 789

<212> DNA

<213> *Euglena gracilis*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(789)

<223> Delta-5-Elongase

<400> 133

atg ctg ggg gcc atc gcg gac gtc gtg ctc cgg ggg ccc gcc gca ttc  
 Met Leu Gly Ala Ile Ala Asp Val Val Leu Arg Gly Pro Ala Ala Phe  
 1 5 10 15

48

cac tgg gac cct gcc acc acc ccg ctc gca tcg atc gtc agc ccc tgt

96

## 207

His Trp Asp Pro Ala Thr Thr Pro Leu Ala Ser Ile Val Ser Pro Cys	
20 25 30	
gtg gcc tcc gtg gcg tac ctg ggg gcc atc ggg ctg ctg aag cgc cgc	144
Val Ala Ser Val Ala Tyr Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Lys Arg Arg	
35 40 45	
act gga ccg gag gtc cgc tcc aag ccc ttc gag ctg cta cac aac ggg	192
Thr Gly Pro Glu Val Arg Ser Lys Pro Phe Glu Leu Leu His Asn Gly	
50 55 60	
ctg ctg gtg ggc tgg tcc ctc gtg gtg ctg ctc ggg acg ctg tac ggc	240
Leu Leu Val Gly Trp Ser Leu Val Val Leu Leu Gly Thr Leu Tyr Gly	
65 70 75 80	
gcg tac cag cgc gtg cag gag gac ggc cgg ggg gtg cag gcc ctg ctg	288
Ala Tyr Gln Arg Val Gln Glu Asp Gly Arg Gly Val Gln Ala Leu Leu	
85 90 95	
tgc acc cag cgg cca cca tct cag atc tgg gac ggc ccg gtg ggg tac	336
Cys Thr Gln Arg Pro Pro Ser Gln Ile Trp Asp Gly Pro Val Gly Tyr	
100 105 110	
ttc acg tac ctt ttc tac ctc gcg aag tac tgg gag ctg gtg gac act	384
Phe Thr Tyr Leu Phe Tyr Leu Ala Lys Tyr Trp Glu Leu Val Asp Thr	
115 120 125	
gtc atc ctc gcc ctc cgc cag aag ccc acc atc ccc ctc cac gtc tac	432
Val Ile Leu Ala Leu Arg Gln Lys Pro Thr Ile Pro Leu His Val Tyr	
130 135 140	
cat cac gcc gtc atg ctg ttc att gtg tgg tgc tgg ttc gcg cac ccc	480
His His Ala Val Met Leu Phe Ile Val Trp Ser Trp Phe Ala His Pro	
145 150 155 160	
tgg ctc gag ggg agc tgg tgg tgc tcc ctg gtc aac tct ttc atc cac	528
Trp Leu Glu Gly Ser Trp Trp Cys Ser Leu Val Asn Ser Phe Ile His	
165 170 175	
acg gtg atg tac tgc tat tac acc ctg acg gtg gtt ggc atc aac cct	576
Thr Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Thr Leu Thr Val Val Gly Ile Asn Pro	
180 185 190	
tgg tgg aag aag tgg atg acc acc atg cag atc atc cag ttc atc acg	624
Trp Trp Lys Lys Trp Met Thr Thr Met Gln Ile Ile Gln Phe Ile Thr	
195 200 205	
ggc tgc gtg tac gtc acg gcg ttc ttc ggc cta tac tat gcc ggg gcg	672
Gly Cys Val Tyr Val Thr Ala Phe Phe Gly Leu Tyr Tyr Ala Gly Ala	
210 215 220	
ggc tgc acc tcc aac gtg tac act gcc tgg ttc tgc atg ggg gtc aac	720
Gly Cys Thr Ser Asn Val Tyr Thr Ala Trp Phe Ser Met Gly Val Asn	
225 230 235 240	
ctc agc ttt ctg tgg ctc ttc gct ctt ttc ttc cgc cgg tgc tac agc	768
Leu Ser Phe Leu Trp Leu Phe Ala Leu Phe Phe Arg Arg Ser Tyr Ser	
245 250 255	
aaa cct agc cgg aag gag tag	789
Lys Pro Ser Arg Lys Glu	
260	

&lt;210&gt; 134

&lt;211&gt; 262

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Euglena gracilis

&lt;400&gt; 134

Met Leu Gly Ala Ile Ala Asp Val Val Leu Arg Gly Pro Ala Ala Phe  
 1 5 10 15

His Trp Asp Pro Ala Thr Thr Pro Leu Ala Ser Ile Val Ser Pro Cys  
 20 25 30

Val Ala Ser Val Ala Tyr Leu Gly Ala Ile Gly Leu Leu Lys Arg Arg  
 35 40 45

Thr Gly Pro Glu Val Arg Ser Lys Pro Phe Glu Leu Leu His Asn Gly  
 50 55 60

Leu Leu Val Gly Trp Ser Leu Val Val Leu Leu Gly Thr Leu Tyr Gly  
 65 70 75 80

Ala Tyr Gln Arg Val Gln Glu Asp Gly Arg Gly Val Gln Ala Leu Leu  
 85 90 95

Cys Thr Gln Arg Pro Pro Ser Gln Ile Trp Asp Gly Pro Val Gly Tyr  
 100 105 110

Phe Thr Tyr Leu Phe Tyr Leu Ala Lys Tyr Trp Glu Leu Val Asp Thr  
 115 120 125

Val Ile Leu Ala Leu Arg Gln Lys Pro Thr Ile Pro Leu His Val Tyr  
 130 135 140

His His Ala Val Met Leu Phe Ile Val Trp Ser Trp Phe Ala His Pro  
 145 150 155 160

Trp Leu Glu Gly Ser Trp Trp Cys Ser Leu Val Asn Ser Phe Ile His  
 165 170 175

Thr Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Thr Leu Thr Val Val Gly Ile Asn Pro  
 180 185 190

Trp Trp Lys Lys Trp Met Thr Thr Met Gln Ile Ile Gln Phe Ile Thr  
 195 200 205

Gly Cys Val Tyr Val Thr Ala Phe Phe Gly Leu Tyr Tyr Ala Gly Ala  
 210 215 220

Gly Cys Thr Ser Asn Val Tyr Thr Ala Trp Phe Ser Met Gly Val Asn  
 225 230 235 240

209

Leu Ser Phe Leu Trp Leu Phe Ala Leu Phe Phe Arg Arg Ser Tyr Ser  
 245 250 255

Lys Pro Ser Arg Lys Glu  
 260

&lt;210&gt; 135

&lt;211&gt; 897

&lt;212&gt; DNA

<213> *Arabidopsis thaliana*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(897)

&lt;223&gt; Delta-5-Elongase

<400> 135  
 atg gca tct gtt tac tcc acc cta acc tac tgg ctc gtc cac cac ccc 48  
 Met Ala Ser Val Tyr Ser Thr Leu Thr Tyr Trp Leu Val His His Pro  
 1 5 10 15  
 tac att gcc aac ttc acg tgg acc gaa ggt gaa aca cta ggc tcc acc 96  
 Tyr Ile Ala Asn Phe Thr Trp Thr Glu Gly Glu Thr Leu Gly Ser Thr  
 20 25 30  
 gtt ttc ttt gtc ttt gtc gtc gtc tcc ctt tac ctc tcc gcc aca ttc 144  
 Val Phe Phe Val Phe Val Val Val Ser Leu Tyr Leu Ser Ala Thr Phe  
 35 40 45  
 ctc ctc cga tac acc gtc gat tca ctc ccc aca ctc ggt ccc cgc att 192  
 Leu Leu Arg Tyr Thr Val Asp Ser Leu Pro Thr Leu Gly Pro Arg Ile  
 50 55 60  
 ctc aaa cca atc aca gcc gtt cac agc ctc att ctc ttc ctc ctc tcc 240  
 Leu Lys Pro Ile Thr Ala Val His Ser Leu Ile Leu Phe Leu Leu Ser  
 65 70 75 80  
 tta acc atg gcc gtt ggt tgc act ctc tcc cta atc tct tcc tgc gac 288  
 Leu Thr Met Ala Val Gly Cys Thr Leu Ser Leu Ile Ser Ser Ser Asp  
 85 90 95  
 ccg aag gcg cgt ctc ttc gac gcc gtt tgt ttc ccc ctc gac gtg aaa 336  
 Pro Lys Ala Arg Leu Phe Asp Ala Val Cys Phe Pro Leu Asp Val Lys  
 100 105 110  
 cct aag gga ccg ctt ttc ttt tgg gct caa gtc ttt tac ctc tgc aag 384  
 Pro Lys Gly Pro Leu Phe Phe Trp Ala Gln Val Phe Tyr Leu Ser Lys  
 115 120 125  
 atc ctt gag ttc gta gac aca ctt ctc atc ata ctc aac aaa tca atc 432  
 Ile Leu Glu Phe Val Asp Thr Leu Leu Ile Ile Leu Asn Lys Ser Ile  
 130 135 140  
 caa cgg ctc tgc ttc ctc cac gtc tac cac cac gca acg gtt gtg att 480  
 Gln Arg Leu Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ala Thr Val Val Ile  
 145 150 155 160

## 210

ttg tgc tac ctc tgg tta cga aca cgt caa tcg atg ttt cct gtt ggg 528  
 Leu Cys Tyr Leu Trp Leu Arg Thr Arg Gln Ser Met Phe Pro Val Gly  
 165 170 175

ctc gtg ttg aac tcg acg gtc cat gtg att atg tac ggg tac tat ttc 576  
 Leu Val Leu Asn Ser Thr Val His Val Ile Met Tyr Gly Tyr Tyr Phe  
 180 185 190

ctc tgc gct atc gga tcg agg ccc aag tgg aag aag ttg gtg acg aat 624  
 Leu Cys Ala Ile Gly Ser Arg Pro Lys Trp Lys Lys Leu Val Thr Asn  
 195 200 205

ttt caa atg gtt cag ttt gct ttc ggc atg ggg tta gga gcc gct tgg 672  
 Phe Gln Met Val Gln Phe Ala Phe Gly Met Gly Leu Gly Ala Ala Trp  
 210 215 220

atg ctc cca gag cat tat ttc ggg tcg ggt tgc gcc ggg att tgg aca 720  
 Met Leu Pro Glu His Tyr Phe Gly Ser Gly Cys Ala Gly Ile Trp Thr  
 225 230 235 240

gtt tat ttc aat ggt gtg ttt act gct tct cta ttg gct ctc ttc tac 768  
 Val Tyr Phe Asn Gly Val Phe Thr Ala Ser Leu Leu Ala Leu Phe Tyr  
 245 250 255

aac ttc cac tcc aag aac tat gag aag act aca acg tcg cct ttg tat 816  
 Asn Phe His Ser Lys Asn Tyr Glu Lys Thr Thr Thr Ser Pro Leu Tyr  
 260 265 270

aag atc gaa tcc ttt ata ttt att cac gga gag agg tgg gca aat aaa 864  
 Lys Ile Glu Ser Phe Ile Phe Ile His Gly Glu Arg Trp Ala Asn Lys  
 275 280 285

gcg att aca tta ttt tcc aag aaa aac gat taa 897  
 Ala Ile Thr Leu Phe Ser Lys Lys Asn Asp  
 290 295

&lt;210&gt; 136

&lt;211&gt; 298

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 136

Met Ala Ser Val Tyr Ser Thr Leu Thr Tyr Trp Leu Val His His Pro  
1 5 10 15

Tyr Ile Ala Asn Phe Thr Trp Thr Glu Gly Glu Thr Leu Gly Ser Thr  
20 25 30

Val Phe Phe Val Phe Val Val Ser Leu Tyr Leu Ser Ala Thr Phe  
35 40 45

Leu Leu Arg Tyr Thr Val Asp Ser Leu Pro Thr Leu Gly Pro Arg Ile  
50 55 60

Leu Lys Pro Ile Thr Ala Val His Ser Leu Ile Leu Phe Leu Leu Ser  
65 70 75 80

<213> Arabidopsis thaliana

212

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (1)..(837)

&lt;223&gt; Delta-5-Elongase

&lt;400&gt; 137

atg gca tca att tac tcc tct tta acc tac tgg ctc gtt aac cac ccc	48
Met Ala Ser Ile Tyr Ser Ser Leu Thr Tyr Trp Leu Val Asn His Pro	
1 5 10 15	
tac atc tcc aat ttt act tgg atc gaa ggt gaa acc cta ggc tcc acc	96
Tyr Ile Ser Asn Phe Thr Trp Ile Glu Gly Glu Thr Leu Gly Ser Thr	
20 25 30	
gtc ttt ttc gta tcc gtc gta gtc tcc gtt tac ctc tcc gcc acg ttc	144
Val Phe Phe Val Ser Val Val Val Ser Val Tyr Leu Ser Ala Thr Phe	
35 40 45	
ctc ctc cga tcc gcc atc gat tca ctc cca tca ctc agt cca cgt atc	192
Leu Leu Arg Ser Ala Ile Asp Ser Leu Pro Ser Leu Ser Pro Arg Ile	
50 55 60	
ctc aaa ccg atc aca gcc gtc cac agc cta atc ctc tgt ctc ctc tcc	240
Leu Lys Pro Ile Thr Ala Val His Ser Leu Ile Leu Cys Leu Leu Ser	
65 70 75 80	
tta gtc atg gcc gtc ggt tgc act ctc tca ata acc tca tct cac gcg	288
Leu Val Met Ala Val Gly Cys Thr Leu Ser Ile Thr Ser Ser His Ala	
85 90 95	
tct tca gat ccg atg gcg cgt ttc ctt cac gcg att tgc ttt ccc gtc	336
Ser Ser Asp Pro Met Ala Arg Phe Leu His Ala Ile Cys Phe Pro Val	
100 105 110	
gac gtt aaa cct aac gga ccg ctt ttc ttc tgg gct caa gtc ttc tac	384
Asp Val Lys Pro Asn Gly Pro Leu Phe Phe Trp Ala Gln Val Phe Tyr	
115 120 125	
ctc tcg aag atc ctc gag ttc gga gac acg atc ctc atc ata ctc ggc	432
Leu Ser Lys Ile Leu Glu Phe Gly Asp Thr Ile Leu Ile Ile Leu Gly	
130 135 140	
aaa tca atc caa ccg cta tcc ttc ctc cac gtg tac cac cac gcg acg	480
Lys Ser Ile Gln Arg Leu Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ala Thr	
145 150 155 160	
gtt gtg gtc atg tgt tat ctc tgg ctc cga act cgc caa tcg atg ttt	528
Val Val Val Met Cys Tyr Leu Trp Leu Arg Thr Arg Gln Ser Met Phe	
165 170 175	
ccg att gcg ctc gtg acg aat tcg acg gta cac gtc atc atg tac ggt	576
Pro Ile Ala Leu Val Thr Asn Ser Thr Val His Val Ile Met Tyr Gly	
180 185 190	
tac tac ttc ctc tgc gcc gtt gga tcg agg ccc aag tgg aag aga ttg	624
Tyr Tyr Phe Leu Cys Ala Val Gly Ser Arg Pro Lys Trp Lys Arg Leu	
195 200 205	
gtg acg gat tgt cag att gtt cag ttt gtt ttc agt ttc ggg tta tcc	672
Val Thr Asp Cys Gln Ile Val Gln Phe Val Phe Ser Phe Gly Leu Ser	
210 215 220	
ggt tgg atg ctc cga gag cac tta ttc ggg tcg ggt tgc acc ggg att	720

## 213

Gly Trp Met Leu Arg Glu His Leu Phe Gly Ser Gly Cys Thr Gly Ile  
 225 230 235 240  
 tgg gga tgg tgt ttc aac gct gca ttt aat gct tct ctt ttg gct ctc 768  
 Trp Gly Trp Cys Phe Asn Ala Ala Phe Asn Ala Ser Leu Leu Ala Leu  
 245 250 255  
 ttt tcc aac ttc cat tca aag aat tat gtc aag aag cca acg aga gag 816  
 Phe Ser Asn Phe His Ser Lys Asn Tyr Val Lys Lys Pro Thr Arg Glu  
 260 265 270  
 gat ggc aaa aaa agc gat tag 837  
 Asp Gly Lys Lys Ser Asp  
 275

&lt;210&gt; 138

&lt;211&gt; 278

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Arabidopsis thaliana

&lt;400&gt; 138

Met Ala Ser Ile Tyr Ser Ser Leu Thr Tyr Trp Leu Val Asn His Pro  
 1 5 10 15

Tyr Ile Ser Asn Phe Thr Trp Ile Glu Gly Glu Thr Leu Gly Ser Thr  
 20 25 30

Val Phe Phe Val Ser Val Val Val Ser Val Tyr Leu Ser Ala Thr Phe  
 35 40 45

Leu Leu Arg Ser Ala Ile Asp Ser Leu Pro Ser Leu Ser Pro Arg Ile  
 50 55 60

Leu Lys Pro Ile Thr Ala Val His Ser Leu Ile Leu Cys Leu Leu Ser  
 65 70 75 80

Leu Val Met Ala Val Gly Cys Thr Leu Ser Ile Thr Ser Ser His Ala  
 85 90 95

Ser Ser Asp Pro Met Ala Arg Phe Leu His Ala Ile Cys Phe Pro Val  
 100 105 110

Asp Val Lys Pro Asn Gly Pro Leu Phe Phe Trp Ala Gln Val Phe Tyr  
 115 120 125

Leu Ser Lys Ile Leu Glu Phe Gly Asp Thr Ile Leu Ile Ile Leu Gly  
 130 135 140

Lys Ser Ile Gln Arg Leu Ser Phe Leu His Val Tyr His His Ala Thr  
 145 150 155 160



## 214

Val Val Val Met Cys Tyr Leu Trp Leu Arg Thr Arg Gln Ser Met Phe  
 165 170 175

Pro Ile Ala Leu Val Thr Asn Ser Thr Val His Val Ile Met Tyr Gly  
 180 185 190

Tyr Tyr Phe Leu Cys Ala Val Gly Ser Arg Pro Lys Trp Lys Arg Leu  
 195 200 205

Val Thr Asp Cys Gln Ile Val Gln Phe Val Phe Ser Phe Gly Leu Ser  
 210 215 220

Gly Trp Met Leu Arg Glu His Leu Phe Gly Ser Gly Cys Thr Gly Ile  
 225 230 235 240

Trp Gly Trp Cys Phe Asn Ala Ala Phe Asn Ala Ser Leu Leu Ala Leu  
 245 250 255

Phe Ser Asn Phe His Ser Lys Asn Tyr Val Lys Lys Pro Thr Arg Glu  
 260 265 270

Asp Gly Lys Lys Ser Asp  
 275

<210> 139

<211> 6

<212> PRT

<213> Konsensus

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (6)

<223> Xaa in der Position 3 und 4 in der Sequenz hat die in Tabelle A w  
 iedergegebene Bedeutung.

<400> 139

Leu His Xaa Xaa His His  
 1 5

<210> 140

<211> 8

<212> PRT

<213> Konsensus

**This Page Blank (uspto)**

Thr Gln Ala Gln Xaa Xaa Gln Phe  
1 5

<210> 143

<211> 60

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(60)

<223>

<400> 143  
gtcgaccgc ggactagtgg gccctctaga cccgggggat ccggatctgc tggctatgaa 60

<210> 144

<211> 60

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(60)

<223>

<400> 144  
gtcgaccgc ggactagtgg gccctctaga cccgggggat ccggatctgc tggctatgaa 60

<210> 145

<211> 36

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

217

&lt;222&gt; (1)..(36)

&lt;223&gt;

<400> 145  
ggtaccacat aatgtgcgtg gagacggaaa ataacg

36

&lt;210&gt; 146

&lt;211&gt; 33

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(33)

&lt;223&gt;

<400> 146  
ctcgagttac gccgtctttc cggagtgttg gcc

33

&lt;210&gt; 147

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(24)

&lt;223&gt;

<400> 147  
gcggccgctt acgtggactt ggtc

24

&lt;210&gt; 148

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 148

gcggccgcat ggcgacgaag gagg

24

<210> 149

<211> 25

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 149

taagcttaca tggcgacgaa ggagg

25

<210> 150

<211> 24

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(24)

<223>

<400> 150

tggatccact tacgtggact tggt

24

<210> 151

<211> 60

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(60)

<223>

<400> 151  
gtcgcacccgc ggactagtgg gccctctaga cccgggggat ccggatctgc tggctatgaa 60

<210> 152

<211> 31

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(31)

<223>

<400> 152  
gcggccgcac catgtgctca ccaccgccgt c 31

<210> 153

<211> 26

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 153  
gcggccgcct acatggcacc agtaac 26

<210> 154

220

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(31)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 154

gcggccgcac catgtgctca tcaccgcgt c

31

&lt;210&gt; 155

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(26)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 155

gcggccgcct acatggcacc agtaac

26

&lt;210&gt; 156

&lt;211&gt; 31

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(31)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 156

gcggccgcac catggacgcc tacaacgctg c

31

<210> 157

<211> 27

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(27)

<223>

<400> 157  
gcggccgcct aagcactctt cttcttt

27

<210> 158

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(23)

<223>

<400> 158  
accatgtgct caccaccgcc gtc

23

<210> 159

<211> 18

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(18)

<223>



<400> 159  
ctacatggca ccagtaac

18

<210> 160

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(23)

<223>

<400> 160  
accatgtgct catcaccgcc gtc

23

<210> 161

<211> 18

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(18)

<223>

<400> 161  
ctacatggca ccagtaac

18

<210> 162

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

223

&lt;222&gt; (1) .. (23)

&lt;223&gt;

<400> 162  
accatggacg cctacaacgc tgc

23

&lt;210&gt; 163

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1) .. (19)

&lt;223&gt;

<400> 163  
ctaagcactc ttcttcttt

19

&lt;210&gt; 164

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1) .. (60)

&lt;223&gt;

<400> 164  
gtcgacccgc ggactagtgg gccctctaga cccgggggat ccggatctgc tggctatgaa 60

&lt;210&gt; 165

&lt;211&gt; 60

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

<220>

<221> misc\_feature,

<222> (1)..(60)

<223>

<400> 165  
gtcgacccgc ggactagtgg gccctctaga cccgggggat ccgatctgc tggctatgaa 60

<210> 166

<211> 29

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 166  
gcggccgcat aatgacgagc aacatgagc 29

<210> 167

<211> 29

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 167  
gcggccgctt aggcgcgactt ggccttggg 29

<210> 168

<211> 34

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(34)

<223>

<400> 168  
gcggccgcac catggacgtc gtcgagcagc aatg

34

<210> 169

<211> 36

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(36)

<223>

<400> 169  
gcggccgctt agatggtctt ctgcttcttg ggcgcc

36

<210> 170

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(23)

<223>

<400> 170  
gacataatga cgagcaacat gag

23

<210> 171

<211> 25

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(25)

<223>

<400> 171

cggttaggc cgacttgcc ttggg

25

<210> 172

<211> 30

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(30)

<223>

<400> 172

agacataatg gacgtcgctg agcagcaatg

30

<210> 173

<211> 28

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 173

ttagatggtc ttctgttct tgggcgcc

28

<210> 174

<211> 60

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(60)

<223>

<400> 174  
gtcgacccgc ggactagtgg gccctctaga cccgggggat ccggatctgc tggctatgaa 60

<210> 175

<211> 29

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(29)

<223>

<400> 175  
gcggccgcgat aatggcttca acatggcaa 29

<210> 176

<211> 32

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(32)

<223>

<400> 176  
gcggccgctt atgtcttctt gctcttcttg tt

32

<210> 177

<211> 26

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(26)

<223>

<400> 177  
gcggccgcat aatggagact tttaat

26

<210> 178

<211> 28

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(28)

<223>

<400> 178  
gcggccgctc agtccccct cactttcc

28

<210> 179

<211> 29

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

229

&lt;222&gt; (1)..(29)

&lt;223&gt;

<400> 179  
aagcttacat aatggcttca acatggcaa

29

&lt;210&gt; 180

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(30)

&lt;223&gt;

<400> 180  
ggatccttat gtcttcttgc tcttctgtt

30

&lt;210&gt; 181

&lt;211&gt; 26

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(26)

&lt;223&gt;

<400> 181  
aagcttacat aatggagact tttaat

26

&lt;210&gt; 182

&lt;211&gt; 27

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer



&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(27)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 182

ggatccttca gteccccctc actttcc

27

&lt;210&gt; 183

&lt;211&gt; 993

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Phaeodactylum tricornutum

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (103)..(939)

&lt;223&gt; Delta-6-Elongase

&lt;400&gt; 183

ggctctttgt ggtagctatc gtcattcacac gcagggtcgtt gctcactatc gtgatccgta 60

tattgaccgt gcacttgtgt aaaacagaga tatttcaaga gt atg atg gta cct 114  
Met Met Val Pro  
1tca agt tat gac gag tat atc gtc atg gtc aac gac ctt ggc gac tct 162  
Ser Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Val Met Val Asn Asp Leu Gly Asp Ser  
5 10 15 20att ctg agc tgg gcc gac cct gat cac tat cgt gga cat acc gag gga 210  
Ile Leu Ser Trp Ala Asp Pro Asp His Tyr Arg Gly His Thr Glu Gly  
25 30 35tgg gag ttc act gac ttt tct gct gct ttt agc att gcc gtc gcg tac 258  
Trp Glu Phe Thr Asp Phe Ser Ala Ala Phe Ser Ile Ala Val Ala Tyr  
40 45 50ctc ctg ttt gtc ttt gtt gga tct ctc att atg agt atg gga gtc ccc 306  
Leu Leu Phe Val Phe Val Gly Ser Leu Ile Met Ser Met Gly Val Pro  
55 60 65gca att gac cct tat ccg ctc aag ttt gtc tac aat gtt tca cag att 354  
Ala Ile Asp Pro Tyr Pro Leu Lys Phe Val Tyr Asn Val Ser Gln Ile  
70 75 80atg ctt tgt gct tac atg acc att gaa gcc agt ctt cta gct tat cgt 402  
Met Leu Cys Ala Tyr Met Thr Ile Glu Ala Ser Leu Leu Ala Tyr Arg  
85 90 95 100aac ggc tac aca ttc tgg cct tgc aac gat tgg gac ttt gaa aag ccg 450  
Asn Gly Tyr Thr Phe Trp Pro Cys Asn Asp Trp Asp Phe Glu Lys Pro  
105 110 115

## 231

cct atc gct aag ctc ctc tgg ctc ttt tac gtt tcc aaa att tgg gat 498  
 Pro Ile Ala Lys Leu Leu Trp Leu Phe Tyr Val Ser Lys Ile Trp Asp  
 120 125 130

ttt tgg gac acc atc ttt att gtt ctc ggg aag aag tgg cgt caa ctt 546  
 Phe Trp Asp Thr Ile Phe Ile Val Leu Gly Lys Lys Trp Arg Gln Leu  
 135 140 145

tcc ttc ctg cac gtc tac cat cac acc acc atc ttt ctc ttc tac tgg 594  
 Ser Phe Leu His Val Tyr His His Thr Thr Ile Phe Leu Phe Tyr Trp  
 150 155 160

ttg aat gca cat gta aac ttt gat ggt gat att ttc ctc acc atc gtc 642  
 Leu Asn Ala His Val Asn Phe Asp Gly Asp Ile Phe Leu Thr Ile Val  
 165 170 175 180

ttg aac ggt ttc atc cac acc gtc atg tac acg tac tac ttc att tgc 690  
 Leu Asn Gly Phe Ile His Thr Val Met Tyr Thr Tyr Tyr Phe Ile Cys  
 185 190 195

atg cac acc aag gtc cca gag acc ggc aaa tcc ttg ccc att tgg tgg 738  
 Met His Thr Lys Val Pro Glu Thr Gly Lys Ser Leu Pro Ile Trp Trp  
 200 205 210

aaa tct agt ttg aca agc atg cag ctg gtg cag ttc atc acg atg atg 786  
 Lys Ser Ser Leu Thr Ser Met Gln Leu Val Gln Phe Ile Thr Met Met  
 215 220 225

acg cag gct atc atg atc ttg tac aag ggc tgt gct gct ccc cat agc 834  
 Thr Gln Ala Ile Met Ile Leu Tyr Lys Gly Cys Ala Ala Pro His Ser  
 230 235 240

cgg gtg gtg aca tcg tac ttg gtt tac att ttg tcg ctc ttt att ttg 882  
 Arg Val Val Thr Ser Tyr Leu Val Tyr Ile Leu Ser Leu Phe Ile Leu  
 245 250 255 260

ttc gcc cag ttc ttt gtc agc tca tac ctc aag ccg aag aag aag aag 930  
 Phe Ala Gln Phe Phe Val Ser Ser Tyr Leu Lys Pro Lys Lys Lys Lys  
 265 270 275

aca gct taa gcgaaatttg ggtctacggt aaaacaatta cggtacaaaa 979  
 Thr Ala

aaaaaaaaaa aaaa 993

<210> 184  
 <211> 278  
 <212> PRT  
 <213> Phaeodactylum tricornutum

<400> 184  
 Met Met Val Pro Ser Ser Tyr Asp Glu Tyr Ile Val Met Val Asn Asp  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Asp Ser Ile Leu Ser Trp Ala Asp Pro Asp His Tyr Arg Gly  
 20 25 30

## 232

His Thr Glu Gly Trp Glu Phe Thr Asp Phe Ser Ala Ala Phe Ser Ile  
           35                                  40                                  45

Ala Val Ala Tyr Leu Leu Phe Val Phe Val Gly Ser Leu Ile Met Ser  
           50                                  55                                  60

Met Gly Val Pro Ala Ile Asp Pro Tyr Pro Leu Lys Phe Val Tyr Asn  
   65                                  70                                  75                                  80

Val Ser Gln Ile Met Leu Cys Ala Tyr Met Thr Ile Glu Ala Ser Leu  
                                   85                                  90                                  95

Leu Ala Tyr Arg Asn Gly Tyr Thr Phe Trp Pro Cys Asn Asp Trp Asp  
                                   100                                  105                                  110

Phe Glu Lys Pro Pro Ile Ala Lys Leu Leu Trp Leu Phe Tyr Val Ser  
           115                                  120                                  125

Lys Ile Trp Asp Phe Trp Asp Thr Ile Phe Ile Val Leu Gly Lys Lys  
   130                                  135                                  140

Trp Arg Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr His His Thr Thr Ile Phe  
   145                                  150                                  155                                  160

Leu Phe Tyr Trp Leu Asn Ala His Val Asn Phe Asp Gly Asp Ile Phe  
                                   165                                  170                                  175

Leu Thr Ile Val Leu Asn Gly Phe Ile His Thr Val Met Tyr Thr Tyr  
                                   180                                  185                                  190

Tyr Phe Ile Cys Met His Thr Lys Val Pro Glu Thr Gly Lys Ser Leu  
           195                                  200                                  205

Pro Ile Trp Trp Lys Ser Ser Leu Thr Ser Met Gln Leu Val Gln Phe  
           210                                  215                                  220

Ile Thr Met Met Thr Gln Ala Ile Met Ile Leu Tyr Lys Gly Cys Ala  
   225                                  230                                  235                                  240

Ala Pro His Ser Arg Val Val Thr Ser Tyr Leu Val Tyr Ile Leu Ser  
                                   245                                  250                                  255

Leu Phe Ile Leu Phe Ala Gln Phe Phe Val Ser Ser Tyr Leu Lys Pro  
           260                                  265                                  270

Lys Lys Lys Lys Thr Ala  
           275

<210> 185

<211> 20

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(20)

<223> N in den Positionen 3 und 18 bedeutet C oder T.

<400> 185  
aanctuctut ggctuttnta

20

<210> 186

<211> 23

<212> DNA

<213> Primer

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(23)

<223> N in den Positionen 3 und 15 bedeutet C oder T. N in den Positionen 9, 12 und 21 bedeutet A oder G.

<400> 186  
gantguacna anaantgugc naa

23

<210> 187

<211> 446

<212> DNA

<213> PCR-Fragment

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)..(446)

<223> PCR-Fragment

<400> 187  
aagctcctct ggctctttta cgtttcacaa atttgggatt tttgggacac catctttatt

60

## 234

gttctcggga agaagtggcg tcaactttcc ttctgcacg tctaccatca caccaccatc 120  
tttctcttct actggttgaa tgcacatgta aactttgatg gtgatatttt cctcaccatc 180  
gtcttgaacg gtttcatcca caccgtcatg tacacgtact acttcatttg catgcacacc 240  
aaggtcccag agaccggcaa atccttgccc atttggtgga aatctagttt gacaagcatg 300  
cagctggtgc agttcatcac gatgatgacg caggctatca tgatcttgta caagggctgt 360  
gctgctcccc atagccgggt ggtgacatcg tacttggttt acattttgtc gctctttatt 420  
ttgttcgccc agttctttgt cagctc 446

&lt;210&gt; 188

&lt;211&gt; 30

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(30)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 188

gcggccgcac ataatgatgg taccttcaag

30

&lt;210&gt; 189

&lt;211&gt; 22

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(22)

&lt;223&gt;

&lt;400&gt; 189

gaagacagct taatagacta gt

22

&lt;210&gt; 190

&lt;211&gt; 31

**This Page Blank (uspto)**



## 235

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(31)

&lt;223&gt;

<400> 190  
gcggccgcac catgatggta ccttcaagtt a

31

&lt;210&gt; 191

&lt;211&gt; 24

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Primer

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1)..(24)

&lt;223&gt;

<400> 191  
gaagacagct taataggcgg ccgc

24

&lt;210&gt; 192

&lt;211&gt; 859

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; PCR-Produkt

<400> 192  
gcggccgcac ataatgatgg taccttcaag ttatgacgag tatatcgtca tgggtcaacga 60  
ccttggcgac tctattctga gctgggccga ccctgatcac tatcgtggac ataccgaggg 120  
atgggaggttc actgactttt ctgctgcttt tagcattgcc gtcgcgtacc tcctgtttgt 180  
ctttgttggga tctctcatta tgagtatggg agtccccgca attgaccctt atccgctcaa 240  
gtttgtctac aatgtttcac agattatgct ttgtgcttac atgaccattg aagccagtct 300  
tctagettat cgtaacggct acacattctg gccttgcaac gattggggact ttgaaaagcc 360  
gcctatcgct aagctcctct ggctctttta cgtttccaaa atttgggatt tttgggacac 420

catctttatt gttctcggga agaagtggcg tcaactttcc ttctgcacg tctaccatca 480  
 caccaccatc tttctcttct actggttgaa tgcacatgta aactttgatg gtgatatttt 540  
 cctcaccatc gtcttgaacg gtttcatcca caccgtcatg tacacgtact acttcatttg 600  
 catgcacacc aagggtcccag agaccggcaa atccttgccc atttggtgga aatctaagttt 660  
 gacaagcatg cagctgggtgc agttcatcac gatgatgacg caggetatca tgatcttgta 720  
 caagggctgt gctgctcccc atagccgggt ggtgacatcg tacttggttt acattttgtc 780  
 gctctttatt ttgttcgccc agttctttgt cagctcatac ctcaagccga agaagaagaa 840  
 gacagcttaa tagactagt 859

<210> 193

<211> 1380

<212> DNA

<213> Phytium irregulare

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1380)

<223> Delta-6-Desaturase

<400> 193  
 atg gtg gac ctc aag cct gga gtg aag cgc ctg gtg agc tgg aag gag 48  
 Met Val Asp Leu Lys Pro Gly Val Lys Arg Leu Val Ser Trp Lys Glu  
 1 5 10 15  
 atc cgc gag cac gcg acg ccc gcg acc gcg tgg atc gtg att cac cac 96  
 Ile Arg Glu His Ala Thr Pro Ala Thr Ala Trp Ile Val Ile His His  
 20 25 30  
 aag gtc tac gac atc tcc aag tgg gac tcg cac ccg ggt ggc tcc gtg 144  
 Lys Val Tyr Asp Ile Ser Lys Trp Asp Ser His Pro Gly Gly Ser Val  
 35 40 45  
 atg ctc acg cag gcc ggc gag gac gcc acg gac gcc ttc gcg gtc ttc 192  
 Met Leu Thr Gln Ala Gly Glu Asp Ala Thr Asp Ala Phe Ala Val Phe  
 50 55 60  
 cac ccg tcc tcg gcg ctc aag ctg ctc gag cag ttc tac gtc ggc gac 240  
 His Pro Ser Ser Ala Leu Lys Leu Leu Glu Gln Phe Tyr Val Gly Asp  
 65 70 75 80  
 gtg gac gaa acc tcc aag gcc gag atc gag ggg gag ccg gcg agc gac 288  
 Val Asp Glu Thr Ser Lys Ala Glu Ile Glu Gly Glu Pro Ala Ser Asp  
 85 90 95  
 gag gag cgc gcg cgc cgc gag cgc atc aac gag ttc atc gcg tcc tac 336  
 Glu Glu Arg Ala Arg Arg Glu Arg Ile Asn Glu Phe Ile Ala Ser Tyr  
 100 105 110  
 cgc cgt ctg cgc gtc aag gtc aag ggc atg ggg ctc tac gac gcc agc 384



## 237

Arg	Arg	Leu	Arg	Val	Lys	Val	Lys	Gly	Met	Gly	Leu	Tyr	Asp	Ala	Ser		
		115						120					125				
gcg	ctc	tac	tac	gcg	tgg	aag	ctc	gtg	agc	acg	ttc	ggc	atc	gcg	gtg		432
Ala	Leu	Tyr	Tyr	Ala	Trp	Lys	Leu	Val	Ser	Thr	Phe	Gly	Ile	Ala	Val		
		130				135						140					
ctc	tcg	atg	gcg	atc	tgc	ttc	ttc	ttc	aac	agt	ttc	gcc	atg	tac	atg		480
Leu	Ser	Met	Ala	Ile	Cys	Phe	Phe	Phe	Asn	Ser	Phe	Ala	Met	Tyr	Met		
		145			150					155					160		
gtc	gcc	ggc	gtg	att	atg	ggg	ctc	ttc	tac	cag	cag	tcc	gga	tgg	ctg		528
Val	Ala	Gly	Val	Ile	Met	Gly	Leu	Phe	Tyr	Gln	Gln	Ser	Gly	Trp	Leu		
				165					170					175			
gcg	cac	gac	ttc	ttg	cac	aac	cag	gtg	tgc	gag	aac	cgc	acg	ctc	ggc		576
Ala	His	Asp	Phe	Leu	His	Asn	Gln	Val	Cys	Glu	Asn	Arg	Thr	Leu	Gly		
			180					185					190				
aac	ctt	atc	ggc	tgc	ctc	gtg	ggc	aac	gcc	tgg	cag	ggc	ttc	agc	atg		624
Asn	Leu	Ile	Gly	Cys	Leu	Val	Gly	Asn	Ala	Trp	Gln	Gly	Phe	Ser	Met		
		195					200						205				
cag	tgg	tgg	aag	aac	aag	cac	aac	ctg	cac	cac	gcg	gtg	ccg	aac	ctg		672
Gln	Trp	Trp	Lys	Asn	Lys	His	Asn	Leu	His	His	Ala	Val	Pro	Asn	Leu		
		210				215						220					
cac	agc	gcc	aag	gac	gag	ggc	ttc	atc	ggc	gac	ccg	gac	atc	gac	acc		720
His	Ser	Ala	Lys	Asp	Glu	Gly	Phe	Ile	Gly	Asp	Pro	Asp	Ile	Asp	Thr		
		225			230					235					240		
atg	ccg	ctg	ctg	gcg	tgg	tct	aag	gag	atg	gcg	cgc	aag	gcg	ttc	gag		768
Met	Pro	Leu	Leu	Ala	Trp	Ser	Lys	Glu	Met	Ala	Arg	Lys	Ala	Phe	Glu		
				245					250					255			
tcg	gcg	cac	ggc	ccg	ttc	ttc	atc	cgc	aac	cag	gcg	ttc	cta	tac	ttc		816
Ser	Ala	His	Gly	Pro	Phe	Phe	Ile	Arg	Asn	Gln	Ala	Phe	Leu	Tyr	Phe		
			260					265					270				
ccg	ctg	ctg	ctg	ctc	gcg	cgc	ctg	agc	tgg	ctc	gcg	cag	tcg	ttc	ttc		864
Pro	Leu	Leu	Leu	Leu	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Leu	Ala	Gln	Ser	Phe	Phe		
			275				280						285				
tac	gtg	ttc	acc	gag	ttc	tcg	ttc	ggc	atc	ttc	gac	aag	gtc	gag	ttc		912
Tyr	Val	Phe	Thr	Glu	Phe	Ser	Phe	Gly	Ile	Phe	Asp	Lys	Val	Glu	Phe		
		290				295					300						
gac	gga	ccg	gag	aag	gcg	ggt	ctg	atc	gtg	cac	tac	atc	tgg	cag	ctc		960
Asp	Gly	Pro	Glu	Lys	Ala	Gly	Leu	Ile	Val	His	Tyr	Ile	Trp	Gln	Leu		
		305			310					315				320			
gcg	atc	ccg	tac	ttc	tgc	aac	atg	agc	ctg	ttt	gag	ggc	gtg	gca	tac		1008
Ala	Ile	Pro	Tyr	Phe	Cys	Asn	Met	Ser	Leu	Phe	Glu	Gly	Val	Ala	Tyr		
				325					330					335			
ttc	ctc	atg	ggc	cag	gcg	tcc	tgc	ggc	ttg	ctc	ctg	gcg	ctg	gtg	ttc		1056
Phe	Leu	Met	Gly	Gln	Ala	Ser	Cys	Gly	Leu	Leu	Leu	Ala	Leu	Val	Phe		
			340					345					350				
agt	att	ggc	cac	aac	ggc	atg	tcg	gtg	tac	gag	cgc	gaa	acc	aag	ccg		1104
Ser	Ile	Gly	His	Asn	Gly	Met	Ser	Val	Tyr	Glu	Arg	Glu	Thr	Lys	Pro		
		355				360						365					
gac	ttc	tgg	cag	ctg	cag	gtg	acc	acg	acg	cgc	aac	atc	cgc	gcg	tcg		1152
Asp	Phe	Trp	Gln	Leu	Gln	Val	Thr	Thr	Thr	Arg	Asn	Ile	Arg	Ala	Ser		
		370				375						380					
gta	ttc	atg	gac	tgg	ttc	acc	ggt	ggc	ttg	aac	tac	cag	atc	gac	cat		1200

## 238

Val Phe Met Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Asp His  
 385 390 395 400  
 cac ctg ttc ccg ctg gtg ccg cgc cac aac ttg cca aag gtc aac gtg 1248  
 His Leu Phe Pro Leu Val Pro Arg His Asn Leu Pro Lys Val Asn Val  
 405 410 415  
 ctc atc aag tcg cta tgc aag gag ttc gac atc ccg ttc cac gag acc 1296  
 Leu Ile Lys Ser Leu Cys Lys Glu Phe Asp Ile Pro Phe His Glu Thr  
 420 425 430  
 ggc ttc tgg gag ggc atc tac gag gtc gtg gac cac ctg gcg gac atc 1344  
 Gly Phe Trp Glu Gly Ile Tyr Glu Val Val Asp His Leu Ala Asp Ile  
 435 440 445  
 agc aag gaa ttt atc acc gag ttc cca gcg atg taa 1380  
 Ser Lys Glu Phe Ile Thr Glu Phe Pro Ala Met  
 450 455

&lt;210&gt; 194

&lt;211&gt; 459

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Phytium irregulare

&lt;400&gt; 194

Met Val Asp Leu Lys Pro Gly Val Lys Arg Leu Val Ser Trp Lys Glu  
 1 5 10 15  
 Ile Arg Glu His Ala Thr Pro Ala Thr Ala Trp Ile Val Ile His His  
 20 25 30  
 Lys Val Tyr Asp Ile Ser Lys Trp Asp Ser His Pro Gly Gly Ser Val  
 35 40 45  
 Met Leu Thr Gln Ala Gly Glu Asp Ala Thr Asp Ala Phe Ala Val Phe  
 50 55 60  
 His Pro Ser Ser Ala Leu Lys Leu Leu Glu Gln Phe Tyr Val Gly Asp  
 65 70 75 80  
 Val Asp Glu Thr Ser Lys Ala Glu Ile Glu Gly Glu Pro Ala Ser Asp  
 85 90 95  
 Glu Glu Arg Ala Arg Arg Glu Arg Ile Asn Glu Phe Ile Ala Ser Tyr  
 100 105 110  
 Arg Arg Leu Arg Val Lys Val Lys Gly Met Gly Leu Tyr Asp Ala Ser  
 115 120 125  
 Ala Leu Tyr Tyr Ala Trp Lys Leu Val Ser Thr Phe Gly Ile Ala Val  
 130 135 140

## 239

Leu Ser Met Ala Ile Cys Phe Phe Phe Asn Ser Phe Ala Met Tyr Met  
 145 150 155 160

Val Ala Gly Val Ile Met Gly Leu Phe Tyr Gln Gln Ser Gly Trp Leu  
 165 170 175

Ala His Asp Phe Leu His Asn Gln Val Cys Glu Asn Arg Thr Leu Gly  
 180 185 190

Asn Leu Ile Gly Cys Leu Val Gly Asn Ala Trp Gln Gly Phe Ser Met  
 195 200 205

Gln Trp Trp Lys Asn Lys His Asn Leu His His Ala Val Pro Asn Leu  
 210 215 220

His Ser Ala Lys Asp Glu Gly Phe Ile Gly Asp Pro Asp Ile Asp Thr  
 225 230 235 240

Met Pro Leu Leu Ala Trp Ser Lys Glu Met Ala Arg Lys Ala Phe Glu  
 245 250 255

Ser Ala His Gly Pro Phe Phe Ile Arg Asn Gln Ala Phe Leu Tyr Phe  
 260 265 270

Pro Leu Leu Leu Leu Ala Arg Leu Ser Trp Leu Ala Gln Ser Phe Phe  
 275 280 285

Tyr Val Phe Thr Glu Phe Ser Phe Gly Ile Phe Asp Lys Val Glu Phe  
 290 295 300

Asp Gly Pro Glu Lys Ala Gly Leu Ile Val His Tyr Ile Trp Gln Leu  
 305 310 315 320

Ala Ile Pro Tyr Phe Cys Asn Met Ser Leu Phe Glu Gly Val Ala Tyr  
 325 330 335

Phe Leu Met Gly Gln Ala Ser Cys Gly Leu Leu Leu Ala Leu Val Phe  
 340 345 350

Ser Ile Gly His Asn Gly Met Ser Val Tyr Glu Arg Glu Thr Lys Pro  
 355 360 365

Asp Phe Trp Gln Leu Gln Val Thr Thr Thr Arg Asn Ile Arg Ala Ser  
 370 375 380

Val Phe Met Asp Trp Phe Thr Gly Gly Leu Asn Tyr Gln Ile Asp His  
 385 390 395 400

His Leu Phe Pro Leu Val Pro Arg His Asn Leu Pro Lys Val Asn Val  
 405 410 415

## 240

Leu Ile Lys Ser Leu Cys Lys Glu Phe Asp Ile Pro Phe His Glu Thr  
 420 425 430

Gly Phe Trp Glu Gly Ile Tyr Glu Val Val Asp His Leu Ala Asp Ile  
 435 440 445

Ser Lys Glu Phe Ile Thr Glu Phe Pro Ala Met  
 450 455

<210> 195

<211> 1152

<212> DNA

<213> Calendula officinalis

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(1152)

<223> Delta-12-Desaturase

<400> 195  
 atg ggt gca ggc ggt cga atg caa gat ccc acc aac ggt ggc aac aaa 48  
 Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Gln Asp Pro Thr Asn Gly Gly Asn Lys  
 1 5 10 15  
 acc gag ccc gaa cca atc caa cgg gtc cca cat gaa aaa ccc cca ttc 96  
 Thr Glu Pro Glu Pro Ile Gln Arg Val Pro His Glu Lys Pro Pro Phe  
 20 25 30  
 aca gtt gga gac atc aag aaa gcg atc cca cct cat tgt ttc aac cga 144  
 Thr Val Gly Asp Ile Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Asn Arg  
 35 40 45  
 tcg gta att cgt tca ttt tca tac gtc ttt tac gac ctc aca atc gcg 192  
 Ser Val Ile Arg Ser Phe Ser Tyr Val Phe Tyr Asp Leu Thr Ile Ala  
 50 55 60  
 tca atc ttg tac tac att gcc aac aat tac atc tct acc ctc cct agc 240  
 Ser Ile Leu Tyr Tyr Ile Ala Asn Asn Tyr Ile Ser Thr Leu Pro Ser  
 65 70 75 80  
 ccg ctc gcc tac gtg gca tgg ccc gtt tac tgg gcc gtc caa ggg tgc 288  
 Pro Leu Ala Tyr Val Ala Trp Pro Val Tyr Trp Ala Val Gln Gly Cys  
 85 90 95  
 gtc tta acc ggg gtg tgg gtc ata gcc cac gaa tgt ggc cat cat gct 336  
 Val Leu Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala  
 100 105 110  
 ttt agc gac cac caa tgg ctc gat gac acc gtg ggt ctc gtc ttg cac 384  
 Phe Ser Asp His Gln Trp Leu Asp Thr Val Gly Leu Val Leu His  
 115 120 125  
 tcg ttc cta ctc gtg ccc tac ttt tcg tgg aaa tat agc cac cgt agg 432  
 Ser Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg  
 130 135 140

cac cac tcg aac acg ggc tcg atc gag cac gat gag gtt ttc gtc ccg 480  
 His His Ser Asn Thr Gly Ser Ile Glu His Asp Glu Val Phe Val Pro  
 145 150 155 160  
 aag ttg aaa tcg ggc gtc cgg tca acc gcc cgg tac cta aac aac cca 528  
 Lys Leu Lys Ser Gly Val Arg Ser Thr Ala Arg Tyr Leu Asn Asn Pro  
 165 170 175  
 ccg ggc cga atc ttg acc cta ctc gta acc cta acc ctc ggt tgg cct 576  
 Pro Gly Arg Ile Leu Thr Leu Leu Val Thr Leu Thr Leu Gly Trp Pro  
 180 185 190  
 cta tac ctc acg ttc aac gtt tcg ggc cgt tac tac gac cgg ttc gcg 624  
 Leu Tyr Leu Thr Phe Asn Val Ser Gly Arg Tyr Tyr Asp Arg Phe Ala  
 195 200 205  
 tgc cat ttc gac ccg aat agc ccg atc tac tcg aag cgc gaa cgg gct 672  
 Cys His Phe Asp Pro Asn Ser Pro Ile Tyr Ser Lys Arg Glu Arg Ala  
 210 215 220  
 caa atc ttc ata tcc gac gcc ggg atc tta gcc gta gtc ttc gta ctc 720  
 Gln Ile Phe Ile Ser Asp Ala Gly Ile Leu Ala Val Val Phe Val Leu  
 225 230 235 240  
 ttc cga ctc gca atg acc aaa ggg ctc acg tgg gtc cta acc atg tac 768  
 Phe Arg Leu Ala Met Thr Lys Gly Leu Thr Trp Val Leu Thr Met Tyr  
 245 250 255  
 ggt ggc ccg tta ctc gtg gtc aac ggt ttc cta gtc ttg atc aca ttc 816  
 Gly Gly Pro Leu Leu Val Val Asn Gly Phe Leu Val Leu Ile Thr Phe  
 260 265 270  
 cta caa cac act cac cct tcg ctc ccg cac tat gac tca acc gaa tgg 864  
 Leu Gln His Thr His Pro Ser Leu Pro His Tyr Asp Ser Thr Glu Trp  
 275 280 285  
 gat tgg tta cgt ggg gcc ctc acc aca atc gac cgt gat tac ggg atc 912  
 Asp Trp Leu Arg Gly Ala Leu Thr Thr Ile Asp Arg Asp Tyr Gly Ile  
 290 295 300  
 cta aac aaa gtg ttc cat aac ata acc gac act cac gtg gcc cac cat 960  
 Leu Asn Lys Val Phe His Asn Ile Thr Asp Thr His Val Ala His His  
 305 310 315 320  
 ttg ttc tct aca atg cct cat tac cat gca atg gaa gcc acg aag gtg 1008  
 Leu Phe Ser Thr Met Pro His Tyr His Ala Met Glu Ala Thr Lys Val  
 325 330 335  
 atc aaa ccg att ttg ggc gat tat tat cag ttt gac ggg acc tcg att 1056  
 Ile Lys Pro Ile Leu Gly Asp Tyr Tyr Gln Phe Asp Gly Thr Ser Ile  
 340 345 350  
 ttt aag gcg atg tat cgg gaa aca aag gag tgc att tat gtt gat aag 1104  
 Phe Lys Ala Met Tyr Arg Glu Thr Lys Glu Cys Ile Tyr Val Asp Lys  
 355 360 365  
 gat gag gag gtg aaa gat ggt gtt tat tgg tat cgt aat aag att taa 1152  
 Asp Glu Glu Val Lys Asp Gly Val Tyr Trp Tyr Arg Asn Lys Ile  
 370 375 380

&lt;210&gt; 196

&lt;211&gt; 383

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Calendula officinalis

&lt;400&gt; 196

Met Gly Ala Gly Gly Arg Met Gln Asp Pro Thr Asn Gly Gly Asn Lys  
 1 5 10 15

Thr Glu Pro Glu Pro Ile Gln Arg Val Pro His Glu Lys Pro Pro Phe  
 20 25 30

Thr Val Gly Asp Ile Lys Lys Ala Ile Pro Pro His Cys Phe Asn Arg  
 35 40 45

Ser Val Ile Arg Ser Phe Ser Tyr Val Phe Tyr Asp Leu Thr Ile Ala  
 50 55 60

Ser Ile Leu Tyr Tyr Ile Ala Asn Asn Tyr Ile Ser Thr Leu Pro Ser  
 65 70 75 80

Pro Leu Ala Tyr Val Ala Trp Pro Val Tyr Trp Ala Val Gln Gly Cys  
 85 90 95

Val Leu Thr Gly Val Trp Val Ile Ala His Glu Cys Gly His His Ala  
 100 105 110

Phe Ser Asp His Gln Trp Leu Asp Asp Thr Val Gly Leu Val Leu His  
 115 120 125

Ser Phe Leu Leu Val Pro Tyr Phe Ser Trp Lys Tyr Ser His Arg Arg  
 130 135 140

His His Ser Asn Thr Gly Ser Ile Glu His Asp Glu Val Phe Val Pro  
 145 150 155 160

Lys Leu Lys Ser Gly Val Arg Ser Thr Ala Arg Tyr Leu Asn Asn Pro  
 165 170 175

Pro Gly Arg Ile Leu Thr Leu Leu Val Thr Leu Thr Leu Gly Trp Pro  
 180 185 190

Leu Tyr Leu Thr Phe Asn Val Ser Gly Arg Tyr Tyr Asp Arg Phe Ala  
 195 200 205

Cys His Phe Asp Pro Asn Ser Pro Ile Tyr Ser Lys Arg Glu Arg Ala  
 210 215 220

Gln Ile Phe Ile Ser Asp Ala Gly Ile Leu Ala Val Val Phe Val Leu  
 225 230 235 240

Phe Arg Leu Ala Met Thr Lys Gly Leu Thr Trp Val Leu Thr Met Tyr  
 245 250 255

**This Page Blank (uspto)**

## 244

Leu Pro Ala Ile Ala Thr Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly  
 50 55 60  
 cct aga ttg atg gct aag agg gag gct ttt gat cct aag gga ttc atg 240  
 Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met  
 65 70 75 80  
 ctc gct tac aac gct tac caa acc gct ttc aac gtt gtg gtg ctc gga 288  
 Leu Ala Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Ala Phe Asn Val Val Val Leu Gly  
 85 90 95  
 atg ttc gct aga gag atc tct gga ttg gga caa cct gtt tgg gga tct 336  
 Met Phe Ala Arg Glu Ile Ser Gly Leu Gly Gln Pro Val Trp Gly Ser  
 100 105 110  
 act atg cct tgg agc gat agg aag tcc ttc aag att ttg ttg gga gtg 384  
 Thr Met Pro Trp Ser Asp Arg Lys Ser Phe Lys Ile Leu Leu Gly Val  
 115 120 125  
 tgg ctc cat tac aac aat aag tac ctc gag ttg ttg gat act gtg ttc 432  
 Trp Leu His Tyr Asn Asn Lys Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe  
 130 135 140  
 atg gtg gct agg aaa aag acc aag cag ctc tct ttc ttg cat gtg tac 480  
 Met Val Ala Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr  
 145 150 155 160  
 cat cat gct ttg ttg att tgg gct tgg tgg ctt gtt tgt cat ctc atg 528  
 His His Ala Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Leu Val Cys His Leu Met  
 165 170 175  
 gct acc aac gat tgc atc gat gct tat ttc gga gct gct tgc aac tct 576  
 Ala Thr Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Ala Cys Asn Ser  
 180 185 190  
 ttc atc cac atc gtg atg tac tcc tac tac ctc atg tct gct ttg gga 624  
 Phe Ile His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Leu Gly  
 195 200 205  
 att aga tgc cct tgg aag aga tat atc acc cag gct cag atg ttg caa 672  
 Ile Arg Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Ile Thr Gln Ala Gln Met Leu Gln  
 210 215 220  
 ttc gtg atc gtg ttc gct cat gct gtt ttc gtg ctc aga caa aag cac 720  
 Phe Val Ile Val Phe Ala His Ala Val Phe Val Leu Arg Gln Lys His  
 225 230 235 240  
 tgc cct gtt act ttg cct tgg gca caa atg ttc gtg atg aca aat atg 768  
 Cys Pro Val Thr Leu Pro Trp Ala Gln Met Phe Val Met Thr Asn Met  
 245 250 255  
 ttg gtg ctc ttc gga aac ttc tac ctc aag gct tac tct aac aag tct 816  
 Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Leu Lys Ala Tyr Ser Asn Lys Ser  
 260 265 270  
 agg gga gat gga gct tct tct gtt aag cct gct gag act act aga gca 864  
 Arg Gly Asp Gly Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Glu Thr Thr Arg Ala  
 275 280 285  
 cct tct gtg aga aga acc agg tcc agg aag atc gat tga 903  
 Pro Ser Val Arg Arg Thr Arg Ser Arg Lys Ile Asp  
 290 295 300

&lt;210&gt; 198

&lt;211&gt; 300



&lt;212&gt; PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

&lt;400&gt; 198

Met Ser Ala Ser Gly Ala Leu Leu Pro Ala Ile Ala Phe Ala Ala Tyr  
 1 5 10 15

Ala Tyr Ala Thr Tyr Ala Tyr Ala Phe Glu Trp Ser His Ala Asn Gly  
 20 25 30

Ile Asp Asn Val Asp Ala Arg Glu Trp Ile Gly Ala Leu Ser Leu Arg  
 35 40 45

Leu Pro Ala Ile Ala Thr Thr Met Tyr Leu Leu Phe Cys Leu Val Gly  
 50 55 60

Pro Arg Leu Met Ala Lys Arg Glu Ala Phe Asp Pro Lys Gly Phe Met  
 65 70 75 80

Leu Ala Tyr Asn Ala Tyr Gln Thr Ala Phe Asn Val Val Val Leu Gly  
 85 90 95

Met Phe Ala Arg Glu Ile Ser Gly Leu Gly Gln Pro Val Trp Gly Ser  
 100 105 110

Thr Met Pro Trp Ser Asp Arg Lys Ser Phe Lys Ile Leu Leu Gly Val  
 115 120 125

Trp Leu His Tyr Asn Asn Lys Tyr Leu Glu Leu Leu Asp Thr Val Phe  
 130 135 140

Met Val Ala Arg Lys Lys Thr Lys Gln Leu Ser Phe Leu His Val Tyr  
 145 150 155 160

His His Ala Leu Leu Ile Trp Ala Trp Trp Leu Val Cys His Leu Met  
 165 170 175

Ala Thr Asn Asp Cys Ile Asp Ala Tyr Phe Gly Ala Ala Cys Asn Ser  
 180 185 190

Phe Ile His Ile Val Met Tyr Ser Tyr Tyr Leu Met Ser Ala Leu Gly  
 195 200 205

Ile Arg Cys Pro Trp Lys Arg Tyr Ile Thr Gln Ala Gln Met Leu Gln  
 210 215 220

Phe Val Ile Val Phe Ala His Ala Val Phe Val Leu Arg Gln Lys His  
 225 230 235 240

## 246

Cys Pro Val Thr Leu Pro Trp Ala Gln Met Phe Val Met Thr Asn Met  
 245 250 255

Leu Val Leu Phe Gly Asn Phe Tyr Leu Lys Ala Tyr Ser Asn Lys Ser  
 260 265 270

Arg Gly Asp Gly Ala Ser Ser Val Lys Pro Ala Glu Thr Thr Arg Ala  
 275 280 285

Pro Ser Val Arg Arg Thr Arg Ser Arg Lys Ile Asp  
 290 295 300

<210> 199

<211> 879

<212> DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(879)

<223> Delta-6-Elongase

<400> 199

atg tct gga ttg agg gct cct aac ttc ttg cat agg ttc tgg acc aag 48  
 Met Ser Gly Leu Arg Ala Pro Asn Phe Leu His Arg Phe Trp Thr Lys  
 1 5 10 15

tgg gat tac gct atc tct aag gtg gtg ttc act tgc gct gat tct ttc 96  
 Trp Asp Tyr Ala Ile Ser Lys Val Phe Thr Cys Ala Asp Ser Phe  
 20 25 30

cag tgg gat atc gga cct gtt tct tct tct acc gct cat ttg cct gct 144  
 Gln Trp Asp Ile Gly Pro Val Ser Ser Thr Ala His Leu Pro Ala  
 35 40 45

att gag tct cct act cct ttg gtg acc tct ttg ctc ttc tac ttg gtg 192  
 Ile Glu Ser Pro Thr Pro Leu Val Thr Ser Leu Leu Phe Tyr Leu Val  
 50 55 60

act gtg ttc ttg tgg tac gga aga ttg acc aga tcc tcc gat aag aag 240  
 Thr Val Phe Leu Trp Tyr Gly Arg Leu Thr Arg Ser Ser Asp Lys Lys  
 65 70 75 80

atc aga gag cct acc tgg ttg agg aga ttc atc atc tgc cac aac gct 288  
 Ile Arg Glu Pro Thr Trp Leu Arg Arg Phe Ile Ile Cys His Asn Ala  
 85 90 95

ttc ttg att gtg ctc tcc ttg tac atg tgt ttg gga tgc gtt gct caa 336  
 Phe Leu Ile Val Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Gly Cys Val Ala Gln  
 100 105 110

gct tac caa aac gga tac acc ttg tgg gga aac gag ttc aag gct act 384  
 Ala Tyr Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Trp Gly Asn Glu Phe Lys Ala Thr  
 115 120 125

gag acc caa ttg gct ctc tac atc tac atc ttc tac gtg tcc aag atc 432  
 Glu Thr Gln Leu Ala Leu Tyr Ile Tyr Ile Phe Tyr Val Ser Lys Ile  
 130 135 140

tac gag ttc gtg gat acc tac atc atg ctc ctc aag aac aac ctc agg 480  
 Tyr Glu Phe Val Asp Thr Tyr Ile Met Leu Leu Lys Asn Asn Leu Arg  
 145 150 155 160

caa gtg tct ttc ttg cac atc tac cac cac tct acc atc tct ttc atc 528  
 Gln Val Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Ser Thr Ile Ser Phe Ile  
 165 170 175

tgg tgg atc atc gct aga aga gca cct gga gga gat gct tat ttc tcc 576  
 Trp Trp Ile Ile Ala Arg Arg Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr Phe Ser  
 180 185 190

gct gct ctc aac tct tgg gtt cat gtg tgc atg tac act tac tac ctc 624  
 Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr Tyr Leu  
 195 200 205

ctc tct acc ttg att gga aag gaa gat cct aag agg tct aac tac ctc 672  
 Leu Ser Thr Leu Ile Gly Lys Glu Asp Pro Lys Arg Ser Asn Tyr Leu  
 210 215 220

tgg tgg gga agg cat ttg acc caa atg caa atg ctc cag ttc ttc ttc 720  
 Trp Trp Gly Arg His Leu Thr Gln Met Gln Met Leu Gln Phe Phe Phe  
 225 230 235 240

aac gtg ctc caa gct ctt tat tgc gct tcc ttc tcc act tac cct aag 768  
 Asn Val Leu Gln Ala Leu Tyr Cys Ala Ser Phe Ser Thr Tyr Pro Lys  
 245 250 255

ttc ctc tcc aag atc ttg ctc gtg tac atg atg tct ttg ctc gga ctt 816  
 Phe Leu Ser Lys Ile Leu Leu Val Tyr Met Met Ser Leu Leu Gly Leu  
 260 265 270

ttc gga cac ttc tac tac tct aag cac atc gct gct gct aag ttg caa 864  
 Phe Gly His Phe Tyr Tyr Ser Lys His Ile Ala Ala Ala Lys Leu Gln  
 275 280 285

aag aag cag cag tga 879  
 Lys Lys Gln Gln  
 290

&lt;210&gt; 200

&lt;211&gt; 292

&lt;212&gt; PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

&lt;400&gt; 200

Met Ser Gly Leu Arg Ala Pro Asn Phe Leu His Arg Phe Trp Thr Lys  
 1 5 10 15

Trp Asp Tyr Ala Ile Ser Lys Val Val Phe Thr Cys Ala Asp Ser Phe  
 20 25 30

Gln Trp Asp Ile Gly Pro Val Ser Ser Ser Thr Ala His Leu Pro Ala  
 35 40 45

Ile Glu Ser Pro Thr Pro Leu Val Thr Ser Leu Leu Phe Tyr Leu Val  
 50 55 60

Thr Val Phe Leu Trp Tyr Gly Arg Leu Thr Arg Ser Ser Asp Lys Lys  
 65 70 75 80

Ile Arg Glu Pro Thr Trp Leu Arg Arg Phe Ile Ile Cys His Asn Ala  
 85 90 95

Phe Leu Ile Val Leu Ser Leu Tyr Met Cys Leu Gly Cys Val Ala Gln  
 100 105 110

Ala Tyr Gln Asn Gly Tyr Thr Leu Trp Gly Asn Glu Phe Lys Ala Thr  
 115 120 125

Glu Thr Gln Leu Ala Leu Tyr Ile Tyr Ile Phe Tyr Val Ser Lys Ile  
 130 135 140

Tyr Glu Phe Val Asp Thr Tyr Ile Met Leu Leu Lys Asn Asn Leu Arg  
 145 150 155 160

Gln Val Ser Phe Leu His Ile Tyr His His Ser Thr Ile Ser Phe Ile  
 165 170 175

Trp Trp Ile Ile Ala Arg Arg Ala Pro Gly Gly Asp Ala Tyr Phe Ser  
 180 185 190

Ala Ala Leu Asn Ser Trp Val His Val Cys Met Tyr Thr Tyr Tyr Leu  
 195 200 205

Leu Ser Thr Leu Ile Gly Lys Glu Asp Pro Lys Arg Ser Asn Tyr Leu  
 210 215 220

Trp Trp Gly Arg His Leu Thr Gln Met Gln Met Leu Gln Phe Phe Phe  
 225 230 235 240

Asn Val Leu Gln Ala Leu Tyr Cys Ala Ser Phe Ser Thr Tyr Pro Lys  
 245 250 255

Phe Leu Ser Lys Ile Leu Leu Val Tyr Met Met Ser Leu Leu Gly Leu  
 260 265 270

Phe Gly His Phe Tyr Tyr Ser Lys His Ile Ala Ala Ala Lys Leu Gln  
 275 280 285

Lys Lys Gln Gln  
 290

&lt;210&gt; 201

&lt;211&gt; 1421

&lt;212&gt; DNA

<213> *Ostreococcus tauri*

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; CDS

&lt;222&gt; (26)..(1399)

&lt;223&gt; Delta-6-Desaturase

&lt;400&gt; 201

```

ggatccttaa ttaaggcgcg ccaaa atg tgt gtt gag acc gag aac aac gat      52
Met Cys Val Glu Thr Glu Asn Asn Asp
1                               5

gga atc cct act gtg gag atc gct ttc gat gga gag aga gaa aga gct      100
Gly Ile Pro Thr Val Glu Ile Ala Phe Asp Gly Glu Arg Glu Arg Ala
10                            15                20                25

gag gct aac gtg aag ttg tct gct gag aag atg gaa cct gct gct ttg      148
Glu Ala Asn Val Lys Leu Ser Ala Glu Lys Met Glu Pro Ala Ala Leu
30                            35                            40

gct aag acc ttc gct aga aga tac gtg gtt atc gag gga gtt gag tac      196
Ala Lys Thr Phe Ala Arg Arg Tyr Val Val Ile Glu Gly Val Glu Tyr
45                            50                            55

gat gtg acc gat ttc aaa cat cct gga gga acc gtg att ttc tac gct      244
Asp Val Thr Asp Phe Lys His Pro Gly Gly Thr Val Ile Phe Tyr Ala
60                            65                            70

ctc tct aac act gga gct gat gct act gag gct ttc aag gag ttc cac      292
Leu Ser Asn Thr Gly Ala Asp Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His
75                            80                            85

cac aga tct aga aag gct agg aag gct ttg gct gct ttg cct tct aga      340
His Arg Ser Arg Lys Ala Arg Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ser Arg
90                            95                            100                105

cct gct aag acc gct aaa gtg gat gat gct gag atg ctc cag gat ttc      388
Pro Ala Lys Thr Ala Lys Val Asp Asp Ala Glu Met Leu Gln Asp Phe
110                            115                            120

gct aag tgg aga aag gag ttg gag agg gac gga ttc ttc aag cct tct      436
Ala Lys Trp Arg Lys Glu Leu Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser
125                            130                            135

cct gct cat gtt gct tac aga ttc gct gag ttg gct gct atg tac gct      484
Pro Ala His Val Ala Tyr Arg Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Tyr Ala
140                            145                            150

ttg gga acc tac ttg atg tac gct aga tac gtt gtg tcc tct gtg ttg      532
Leu Gly Thr Tyr Leu Met Tyr Ala Arg Tyr Val Val Ser Ser Val Leu
155                            160                            165

gtt tac gct tgc ttc ttc gga gct aga tgt gga tgg gtt caa cat gag      580
Val Tyr Ala Cys Phe Phe Gly Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu
170                            175                            180                185

gga gga cat tct tct ttg acc gga aac atc tgg tgg gat aag aga atc      628

```

## 250

Gly Gly His Ser Ser Leu Thr Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg Ile	
190 195 200	
caa gct ttc act gct gga ttc gga ttg gct gga tct gga gat atg tgg	676
Gln Ala Phe Thr Ala Gly Phe Gly Leu Ala Gly Ser Gly Asp Met Trp	
205 210 215	
aac tcc atg cac aac aag cac cat gct act cct caa aaa gtg agg cac	724
Asn Ser Met His Asn Lys His His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His	
220 225 230	
gat atg gat ttg gat acc act cct gct gtt gct ttc ttc aac acc gct	772
Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala	
235 240 245	
gtg gag gat aat aga cct agg gga ttc tct aag tac tgg ctc aga ttg	820
Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg Gly Phe Ser Lys Tyr Trp Leu Arg Leu	
250 255 260 265	
caa gct tgg acc ttc att cct gtg act tct gga ttg gtg ttg ctc ttc	868
Gln Ala Trp Thr Phe Ile Pro Val Thr Ser Gly Leu Val Leu Leu Phe	
270 275 280	
tgg atg ttc ttc ctc cat cct tct aag gct ttg aag gga gga aag tac	916
Trp Met Phe Phe Leu His Pro Ser Lys Ala Leu Lys Gly Gly Lys Tyr	
285 290 295	
gag gag ctt gtg tgg atg ttg gct gct cat gtg att aga acc tgg acc	964
Glu Glu Leu Val Trp Met Leu Ala Ala His Val Ile Arg Thr Trp Thr	
300 305 310	
att aag gct gtt act gga ttc acc gct atg caa tcc tac gga ctc ttc	1012
Ile Lys Ala Val Thr Gly Phe Thr Ala Met Gln Ser Tyr Gly Leu Phe	
315 320 325	
ttg gct act tct tgg gtt tcc gga tgc tac ttg ttc gct cac ttc tct	1060
Leu Ala Thr Ser Trp Val Ser Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe Ser	
330 335 340 345	
act tct cac acc cat ttg gat gtt gtt cct gct gat gag cat ttg tct	1108
Thr Ser His Thr His Leu Asp Val Val Pro Ala Asp Glu His Leu Ser	
350 355 360	
tgg gtt agg tac gct gtg gat cac acc att gat atc gat cct tct cag	1156
Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp His Thr Ile Asp Ile Asp Pro Ser Gln	
365 370 375	
gga tgg gtt aac tgg ttg atg gga tac ttg aac tgc caa gtg att cat	1204
Gly Trp Val Asn Trp Leu Met Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile His	
380 385 390	
cac ctc ttc cct tct atg cct caa ttc aga caa cct gag gtg tcc aga	1252
His Leu Phe Pro Ser Met Pro Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser Arg	
395 400 405	
aga ttc gtt gct ttc gct aag aag tgg aac ctc aac tac aag gtg atg	1300
Arg Phe Val Ala Phe Ala Lys Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val Met	
410 415 420 425	
act tat gct gga gct tgg aag gct act ttg gga aac ctc gat aat gtg	1348
Thr Tyr Ala Gly Ala Trp Lys Ala Thr Leu Gly Asn Leu Asp Asn Val	
430 435 440	
gga aag cac tac tac gtg cac gga caa cat tct gga aag acc gct tga	1396
Gly Lys His Tyr Tyr Val His Gly Gln His Ser Gly Lys Thr Ala	
445 450 455	
taa ttaattaagg cgcgccgaat tc	1421

&lt;210&gt; 202

&lt;211&gt; 456

&lt;212&gt; PRT

<213> *Ostreococcus tauri*

&lt;400&gt; 202

Met Cys Val Glu Thr Glu Asn Asn Asp Gly Ile Pro Thr Val Glu Ile  
 1 5 10 15

Ala Phe Asp Gly Glu Arg Glu Arg Ala Glu Ala Asn Val Lys Leu Ser  
 20 25 30

Ala Glu Lys Met Glu Pro Ala Ala Leu Ala Lys Thr Phe Ala Arg Arg  
 35 40 45

Tyr Val Val Ile Glu Gly Val Glu Tyr Asp Val Thr Asp Phe Lys His  
 50 55 60

Pro Gly Gly Thr Val Ile Phe Tyr Ala Leu Ser Asn Thr Gly Ala Asp  
 65 70 75 80

Ala Thr Glu Ala Phe Lys Glu Phe His His Arg Ser Arg Lys Ala Arg  
 85 90 95

Lys Ala Leu Ala Ala Leu Pro Ser Arg Pro Ala Lys Thr Ala Lys Val  
 100 105 110

Asp Asp Ala Glu Met Leu Gln Asp Phe Ala Lys Trp Arg Lys Glu Leu  
 115 120 125

Glu Arg Asp Gly Phe Phe Lys Pro Ser Pro Ala His Val Ala Tyr Arg  
 130 135 140

Phe Ala Glu Leu Ala Ala Met Tyr Ala Leu Gly Thr Tyr Leu Met Tyr  
 145 150 155 160

Ala Arg Tyr Val Val Ser Ser Val Leu Val Tyr Ala Cys Phe Phe Gly  
 165 170 175

Ala Arg Cys Gly Trp Val Gln His Glu Gly Gly His Ser Ser Leu Thr  
 180 185 190

Gly Asn Ile Trp Trp Asp Lys Arg Ile Gln Ala Phe Thr Ala Gly Phe  
 195 200 205

Gly Leu Ala Gly Ser Gly Asp Met Trp Asn Ser Met His Asn Lys His  
 210 215 220

## 252

His Ala Thr Pro Gln Lys Val Arg His Asp Met Asp Leu Asp Thr Thr  
 225 230 235 240

Pro Ala Val Ala Phe Phe Asn Thr Ala Val Glu Asp Asn Arg Pro Arg  
 245 250 255

Gly Phe Ser Lys Tyr Trp Leu Arg Leu Gln Ala Trp Thr Phe Ile Pro  
 260 265 270

Val Thr Ser Gly Leu Val Leu Leu Phe Trp Met Phe Phe Leu His Pro  
 275 280 285

Ser Lys Ala Leu Lys Gly Gly Lys Tyr Glu Glu Leu Val Trp Met Leu  
 290 295 300

Ala Ala His Val Ile Arg Thr Trp Thr Ile Lys Ala Val Thr Gly Phe  
 305 310 315 320

Thr Ala Met Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Leu Ala Thr Ser Trp Val Ser  
 325 330 335

Gly Cys Tyr Leu Phe Ala His Phe Ser Thr Ser His Thr His Leu Asp  
 340 345 350

Val Val Pro Ala Asp Glu His Leu Ser Trp Val Arg Tyr Ala Val Asp  
 355 360 365

His Thr Ile Asp Ile Asp Pro Ser Gln Gly Trp Val Asn Trp Leu Met  
 370 375 380

Gly Tyr Leu Asn Cys Gln Val Ile His His Leu Phe Pro Ser Met Pro  
 385 390 395 400

Gln Phe Arg Gln Pro Glu Val Ser Arg Arg Phe Val Ala Phe Ala Lys  
 405 410 415

Lys Trp Asn Leu Asn Tyr Lys Val Met Thr Tyr Ala Gly Ala Trp Lys  
 420 425 430

Ala Thr Leu Gly Asn Leu Asp Asn Val Gly Lys His Tyr Tyr Val His  
 435 440 445

Gly Gln His Ser Gly Lys Thr Ala  
 450 455



(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES  
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum  
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum  
9. September 2005 (09.09.2005)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer  
WO 2005/083093 A3

- (51) Internationale Patentklassifikation<sup>7</sup>: C11B 1/02, 10 2004 017 518.7 8. April 2004 (08.04.2004) DE  
C12N 9/02, 9/10, A01K 67/027 10 2004 024 014.0 14. Mai 2004 (14.05.2004) DE  
PCT/EP/04/07957 16. Juli 2004 (16.07.2004) EP  
10 2004 062 543.3  
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2005/001863 24. Dezember 2004 (24.12.2004) DE  
(22) Internationales Anmeldedatum:  
23. Februar 2005 (23.02.2005) (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von  
US): BASF PLANT SCIENCE GmbH [DE/DE]; 67056  
Ludwigshafen (DE).  
(25) Einreichungssprache: Deutsch (72) Erfinder; und  
(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CIRPUS, Petra  
[DE/DE]; Landteilstr.12, 68163 Mannheim (DE).  
BAUER, Jörg [DE/DE]; Thorwaldsenstr. 1A, 67061  
Ludwigshafen (DE). QIU, Xiao [CA/CA]; 403 Kendar-  
dine Road, Saskatoon Sk. S7N 3S5 (CA). WU, Guohai  
(30) Angaben zur Priorität:  
10 2004 009 457.8 27. Februar 2004 (27.02.2004) DE  
10 2004 012 370.5 13. März 2004 (13.03.2004) DE

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: METHOD FOR PRODUCING POLYUNSATURATED FATTY ACIDS IN TRANSGENIC PLANTS

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR HERSTELLUNG MEHRFACH UNGESÄTTIGTER FETTSÄUREN IN TRANSGENEN  
PFLANZEN

(57) Abstract: The invention relates to a method for producing polyunsaturated fatty acids in seeds of transgenic plants. Accord-  
ing to said method, nucleic acids, coding for polypeptides with a  $\omega$ -3-desaturase,  $\Delta$ -12-desaturase,  $\Delta$ -6-desaturase,  $\Delta$ -6-elongase,  
 $\Delta$ -5-desaturase,  $\Delta$ -5-elongase and/or  $\Delta$ -4-desaturase activity, preferably for polypeptides with a  $\Delta$ -6-desaturase,  $\Delta$ -6-elongase and  
 $\Delta$ -5-desaturase activity, are introduced into the organism. The nucleic acid sequences are represented by SEQ ID NO: 11, SEQ ID  
NO: 27, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 and SEQ ID NO: 201. Advantageously, said nucleic acid sequences  
can be expressed in the organism optionally together with other nucleic acid sequences that code for polypeptides of the biosynthesis  
of the fatty acid or lipid metabolism. Nucleic acid sequences coding for a  $\Delta$ -6-desaturase,  $\Delta$ -5-desaturase,  $\Delta$ -4-desaturase,  $\Delta$ -1  
2-desaturase and/or  $\Delta$ -6-elongase activity are especially advantageous. Advantageously, said desaturases and elongases originate  
from thalassiosira, euglena or ostreococcus. The invention also relates to a method for producing oils and/or triacylglycerides with  
an increased content of long-chain polyunsaturated fatty acids. In a preferred embodiment, the invention also relates to a method  
for producing arachidonic acid, eicosapentaenic acid or docosahexaenic acid, and to a method for producing triglycerides with an  
increased content of unsaturated fatty acids, especially arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and/or docosahexaenoic acid, in trans-  
genic plants, preferably in seeds of the transgenic plants. The invention further relates to the production of a transgenic plant with  
an increased content of polyunsaturated fatty acids, especially arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and/or docosahexaenoic acid,  
based on the expression of the elongases and desaturases used in the inventive method. The invention also relates to recombinant nu-  
cleic acids molecules containing, together or individually, nucleic acid sequences coding for the polypeptides with a  $\Delta$ -6-desaturase,  
 $\Delta$ -6-elongase,  $\Delta$ -5-desaturase and  $\Delta$ -5-elongase activity, and transgenic plants containing said recombinant nucleic acid molecules.  
Another part of the invention relates to oils, lipids and/or fatty acids produced according to the inventive method, and to the use  
thereof. Furthermore, the invention relates to unsaturated fatty acids and triglycerides with an increased content of unsaturated fatty  
acids, and to the use of the same.

(57) Zusammenfassung: Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren zur Herstellung von mehrfach ungesättigten Fettsäuren  
im Samen transgener Pflanzen, indem Nukleinsäuren in den Organismus eingebracht werden, die für Polypeptide mit  $\omega$ -3-Desa-  
turase-,  $\Delta$ -12-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase-,  $\Delta$ -5-Elongase- und/oder  $\Delta$ -4-Desaturaseaktivität  
bevorzugt für Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase- und  $\Delta$ -5-Desaturaseaktivität codieren. Bei den Nukleinsäurese-  
quenzen handelt es sich um die in SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 193, SEQ ID NO: 197, SEQ ID NO: 199 und  
SEQ ID NO: 201 dargestellten Sequenzen. Vorteilhaft können diese Nukleinsäuresequenzen gegebenenfalls zusammen mit weite-  
ren Nukleinsäuresequenzen, die für Polypeptide der Biosynthese des Fettsäure- oder Lipidstoffwechsels codieren, in dem Organis-  
mus exprimiert werden. Besonders vorteilhaft sind Nukleinsäuresequenzen, die für eine  $\Delta$ -6-Desaturase-, eine  $\Delta$ -5-Desaturase-,  
 $\Delta$ -4-Desaturase-,  $\Delta$ -1 2-Desaturase- und/oder  $\Delta$ -6-Elongaseaktivität codieren. Vorteilhaft stammen diese Desaturasen und Elonga-  
sen aus Thalassiosira, Euglena oder Ostreococcus. Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Herstellung von Ölen und/oder  
Triacylglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an langkettigen mehrfach ungesättigten Fettsäuren. Die Erfindung betrifft in einer  
bevorzugten Ausführungsform ausserdem ein Verfahren zur Herstellung

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

WO 2005/083093 A3



[CA/CA]; 2103 Kenderdine Road, Saskatoon Sk. S7N 4A9 (CA). DATLA, Nagamani [CA/CA]; 527 Bayview Terrace, Saskatoon Sk. S7V 1B6 (CA).

(74) **Anwalt:** PRESSLER, Uwe; c/o BASF Aktiengesellschaft, 67056 Ludwigshafen (DE).

(81) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare nationale Schutzrechtsart): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten** (soweit nicht anders angegeben, für jede verfügbare regionale Schutzrechtsart): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), eurasisches (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

**Veröffentlicht:**

— mit internationalem Recherchenbericht

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen**

**Recherchenberichts:**

16. Februar 2006

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

von Arachidonsäure, Eicosapentaensäure oder Docosahexaensäure sowie ein Verfahren zur Herstellung von Triglyceriden mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure, in transgenen Pflanzen vorteilhaft im Samen der transgenen Pflanze. Die Erfindung betrifft die Herstellung einer transgenen Pflanze mit erhöhtem Gehalt an mehrfach ungesättigten Fettsäuren, insbesondere Arachidonsäure, Eicosapentaensäure und/oder Docosahexaensäure, aufgrund der Expression der im erfindungsgemässen Verfahren verwendeten Elongasen und Desaturasen. Die Erfindung betrifft weiterhin rekombinante Nukleinsäuremoleküle, die die Nukleinsäuresequenzen, die für die Polypeptide mit  $\Delta$ -6-Desaturase-,  $\Delta$ -6-Elongase-,  $\Delta$ -5-Desaturase- und  $\Delta$ -5-Elongaseaktivität kodieren, gemeinsam oder einzeln enthalten, sowie transgene Pflanzen, die die vorgenannten rekombinanten Nukleinsäuremoleküle enthalten. Ein weiterer Teil der Erfindung betrifft Öle, Lipide und/oder Fettsäuren hergestellt nach dem erfindungsgemässen Verfahren und deren Verwendung. Ausserdem betrifft die Erfindung ungesättigte Fettsäuren sowie Triglyceride mit einem erhöhten Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und deren Verwendung.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP2005/001863

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C11B1/02 C12N9/02 C12N9/10 A01K67/027

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C11B C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>DREXLER H ET AL: "Metabolic engineering of fatty acids for breeding of new oilseed crops: Strategies, problems and first results"</p> <p>JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY, FISCHER, STUTTGART, DE, vol. 160, no. 7, July 2003 (2003-07), pages 779-802, XP002266491</p> <p>ISSN: 0176-1617</p> <p>page 781, right-hand column, last paragraph</p> <p>page 794, right-hand column, paragraph 3 -</p> <p>page 796, paragraph 3; figure 6</p> <p>-----</p> <p>-/--</p>	1-14

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.☒ Patent family members are listed in annex.

## \* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

23 August 2005

Date of mailing of the international search report

11.10.2005

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
 NL - 2280 HV Rijswijk  
 Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
 Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Keller, Y

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No  
PCT/EP2005/001863

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	BEAUDOIN FREDERIC ET AL: "Heterologous reconstitution in yeast of the polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 97, no. 12, 6 June 2000 (2000-06-06), pages 6421-6426, XP002200201 ISSN: 0027-8424 abstract page 6421, right-hand column, paragraph 2; figure 1 -----	1-14
X	DE 102 19 203 A1 (BASF PLANT SCIENCE GMBH) 13 November 2003 (2003-11-13) claims 1-14 -----	1-14
T	MEYER ASTRID ET AL: "Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosaheptaenoic acid biosynthesis." JOURNAL OF LIPID RESEARCH. OCT 2004, vol. 45, no. 10, October 2004 (2004-10), pages 1899-1909, XP009046591 ISSN: 0022-2275 the whole document -----	1-14
A	DOMERGUE F ET AL: "Cloning and functional characterization of Phaeodactylum tricornutum front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis" EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, vol. 269, no. 16, August 2002 (2002-08), pages 4105-4113, XP002228745 ISSN: 0014-2956 abstract figures 1,2,4,5 -----	1-14
A	ZANK T K ET AL: "Cloning and functional expression of the first plant fatty acid elongase specific for DELTA6-polyunsaturated fatty acids" BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, COLCHESTER, ESSEX, GB, vol. 28, no. 6, December 2000 (2000-12), pages 654-658, XP002174836 ISSN: 0300-5127 the whole document -----	1-14

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP2005/001863

## Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
2. ☒ Claims Nos.: **53**  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

**See FURTHER INFORMATION SHEET PCT/ ISA/ 210**

3. ☐ Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

## Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

**See supplemental sheet**

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☒ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

**1-14 and 24-35 (in part.)**

Remark on Protest

☐

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

☐

No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims 1-14 and 24-35 (in part)

method of preparing fats/oils/lipids in transgenic organisms  
containing  
(delta 9 desaturase or delta 6 desaturase) and  
(delta 8 desaturase or delta 6 desaturase) and  
delta 5 desaturase and delta 5 elongase and delta 4 elongase.

---

2. Claims 15-17 and 24-35, 37, 38, 41-44 (in part)

method of preparing fats/oils/lipids in transgenic organisms  
containing  
delta 6 desaturase and delta 6 elongase  
delta 5 desaturase.

---

3. Claims 18-20 and 24-35, 37, 39, 41-44 (in part)

method of preparing fats/oils/lipids in transgenic organisms  
containing  
delta 6 desaturase and delta 6 elongase  
delta 5 desaturase and delta 12 desaturase.

---

4. Claims 21-23 and 24-35, 37, 40-44 (in part)

method of preparing fats/oils/lipids in transgenic organisms  
containing  
delta 6 desaturase and delta 6 elongase  
delta 5 desaturase and delta 5 elongase.

---

## 5. Claims 36, 45-48

oils, lipids, fatty acids.

---

## 6. Claim 37 (in part)

use of a delta 12 elongase.

---

## 7. Claim 37 (in part)

use of a delta 6 desaturase.

---

## 8. Claim 37 (in part)

use of a delta 5 desaturase.

---

## 9. Claim 37 (in part)

use of a delta 6 elongase.

---

## 10. Claim 37 (in part)

use of a delta 5 elongase.

---

## 11. Claim 40 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 38,  
additionally containing a delta 5 elongase.

---

## 12. Claim 40 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 38,  
additionally containing a delta 5 elongase.

---

13. Claim 41 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 38,  
additionally containing a fatty acid or lipid metabolic gene.

---

14. Claim 41 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 39,  
additionally containing a fatty acid or lipid metabolic gene.

---

15. Claim 41 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 40,  
additionally containing a fatty acid or lipid metabolic gene.

---

16. Claim 42 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 38,  
additionally containing a delta 4 desaturase.

---

17. Claim 42 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 39,  
additionally containing a delta 4 desaturase.

---

18. Claim 42 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 40,  
additionally containing a delta 4 desaturase.

---



## 19. Claim 42 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 41,  
additionally containing a delta 4 desaturase.

---

## 20. Claim 42 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 38,  
additionally containing a delta 8 desaturase.

---

## 21. Claim 42 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 39,  
additionally containing a delta 8 desaturase.

---

## 22. Claim 42 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 40,  
additionally containing a delta 8 desaturase.

---

## 23. Claim 42 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 41,  
additionally containing a delta 8 desaturase.

---

## 24. Claim 42 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 38,  
additionally containing a delta 9 desaturase.

---

## 25. Claim 42 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 39,  
additionally containing a delta 9 desaturase.

---

## 26. Claim 42 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 40,  
additionally containing a delta 9 desaturase.

---

## 27. Claim 42 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 41,  
additionally containing a delta 9 desaturase.

---

## 28. Claim 42 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 38,  
additionally containing a delta 9 elongase.

---

## 29. Claim 42 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 39,  
additionally containing a delta 9 elongase.

---

## 30. Claim 42 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 40,  
additionally containing a delta 9 elongase.

---

## 31. Claim 42 (in part)

recombinant nucleic acid molecule according to claim 41,  
additionally containing a delta 9 elongase.

---

## 32. Claim 43 (in part)

transgenic plant containing a nucleic acid molecule according to claim 38.

---

33. Claim 43 (in part)

transgenic plant containing a nucleic acid molecule according to claim 39.

---

34. Claim 43 (in part)

transgenic plant containing a nucleic acid molecule according to claim 40.

---

35. Claim 43 (in part)

transgenic plant containing a nucleic acid molecule according to claim 41.

---

36. Claim 43 (in part)

transgenic plant containing a nucleic acid molecule according to claim 42.

---

37. Claims 49 and 52 (in part)

isolated nucleic acid with delta 5 elongase activity (Seq. Id. No. 197).

---

38. Claims 50 and 52, 54 (in part)

isolated nucleic acid with delta 6 elongase activity (Seq. Id. No. 199).

---

## 39. Claims 51 and 52, 54 (in part)

isolated nucleic acid with delta 6 desaturase activity (Seq. Id. No. 201).

---

## 40. Claim 55 (in part)

transgenic plant containing as transgene a nucleic acid with delta 5 elongase activity (Seq. Id. No. 197).

---

## 41. Claim 55 (in part)

transgenic plant containing as transgene a nucleic acid with delta 6 elongase activity (Seq. Id. No. 199).

---

## 42. Claim 55 (in part)

transgenic plant containing as transgene a nucleic acid with delta 6 desaturase activity (Seq. Id. No. 201).

---

## Continuation of II.2

Claim: 53

Claim 53 is unclear because it refers to itself.

The applicant is advised that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established normally cannot be the subject of an international preliminary examination (PCT Rule 66.1(e)). In its capacity as International Preliminary Examining Authority the EPO generally will not carry out a preliminary examination for subjects that have not been searched. This also applies to cases where the claims were amended

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**

International application No.

PCT/EP2005/001863

after receipt of the international search report (PCT Article 19) or where the applicant submits new claims in the course of the procedure under PCT Chapter II. After entry into the regional phase before the EPO, however, an additional search can be carried out in the course of the examination (cf. EPO Guidelines, Part C, VI, 8.5) if the deficiencies that led to the declaration under PCT Article 17(2) have been remedied.

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP2005/001863

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
DE 10219203	A1 · 13-11-2003	AU 2003232512 A1	17-11-2003
		CA 2485060 A1	13-11-2003
		WO 03093482 A2	13-11-2003
		EP 1501932 A2	02-02-2005
-----			

# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2005/001863

## A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 C11B1/02 C12N9/02 C12N9/10 A01K67/027

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

## B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C11B C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, EMBASE, BIOSIS, MEDLINE, WPI Data

## C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>DREXLER H ET AL: "Metabolic engineering of fatty acids for breeding of new oilseed crops: Strategies, problems and first results"</p> <p>JOURNAL OF PLANT PHYSIOLOGY, FISCHER, STUTTGART, DE,</p> <p>Bd. 160, Nr. 7, Juli 2003 (2003-07), Seiten 779-802, XP002266491</p> <p>ISSN: 0176-1617</p> <p>Seite 781, rechte Spalte, letzter Absatz</p> <p>Seite 794, rechte Spalte, Absatz 3 - Seite 796, Absatz 3; Abbildung 6</p> <p style="text-align: center;">-/-</p>	1-14



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

\* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. August 2005

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

1. 10. 2005

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Keller, Y

## C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie <sup>a</sup>	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	<p>BEAUDOIN FREDERIC ET AL: "Heterologous reconstitution in yeast of the polyunsaturated fatty acid biosynthetic pathway"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 97, Nr. 12, 6. Juni 2000 (2000-06-06), Seiten 6421-6426, XP002200201 ISSN: 0027-8424 Zusammenfassung Seite 6421, rechte Spalte, Absatz 2; Abbildung 1</p>	1-14
X	<p>DE 102 19 203 A1 (BASF PLANT SCIENCE GMBH) 13. November 2003 (2003-11-13) Ansprüche 1-14</p>	1-14
T	<p>MEYER ASTRID ET AL: "Novel fatty acid elongases and their use for the reconstitution of docosaehaenoic acid biosynthesis."</p> <p>JOURNAL OF LIPID RESEARCH. OCT 2004, Bd. 45, Nr. 10, Oktober 2004 (2004-10), Seiten 1899-1909, XP009046591 ISSN: 0022-2275 das ganze Dokument</p>	1-14
A	<p>DOMERGUE F ET AL: "Cloning and functional characterization of Phaeodactylum tricornutum front-end desaturases involved in eicosapentaenoic acid biosynthesis"</p> <p>EUROPEAN JOURNAL OF BIOCHEMISTRY, BERLIN, DE, Bd. 269, Nr. 16, August 2002 (2002-08), Seiten 4105-4113, XP002228745 ISSN: 0014-2956 Zusammenfassung Abbildungen 1,2,4,5</p>	1-14
A	<p>ZANK T K ET AL: "Cloning and functional expression of the first plant fatty acid elongase specific for DELTA6-polyunsaturated fatty acids"</p> <p>BIOCHEMICAL SOCIETY TRANSACTIONS, COLCHESTER, ESSEX, GB, Bd. 28, Nr. 6, Dezember 2000 (2000-12), Seiten 654-658, XP002174836 ISSN: 0300-5127 das ganze Dokument</p>	1-14



# INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen  
PCT/EP2005/001863

## Feld II Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☐ Ansprüche Nr.  
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
  
2. ☒ Ansprüche Nr. 53  
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich  
siehe BEIBLATT PCT/ISA/210
  
3. ☐ Ansprüche Nr.  
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

## Feld III Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
  
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
  
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
  
4. ☒ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:  
1-14 und 24-35 (teil.)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.

☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:

## 1. Ansprüche: 1-14 und 24-35 (teil.)

Verfahren zur Herstellung von Fetten/Ölen/Lipiden in transgenen Organismen enthaltend  
(delta 9 desaturase oder delta 6 desaturase) und  
(delta 8 desaturase oder delta 6 elongase) und  
delta 5 desaturase und delta 5 elongase und delta 4 elongase  
---

## 2. Ansprüche: 15-17 und 24-35, 37, 38, 41-44 (teil.)

Verfahren zur Herstellung von Fetten/Ölen/Lipiden in transgenen Organismen enthaltend  
delta 6 desaturase und delta 6 elongase  
delta 5 desaturase  
---

## 3. Ansprüche: 18-20 und 24-35, 37, 39, 41-44 (teil.)

Verfahren zur Herstellung von Fetten/Ölen/Lipiden in transgenen Organismen enthaltend  
delta 6 desaturase und delta 6 elongase  
delta 5 desaturase und delta 12 desaturase  
---

## 4. Ansprüche: 21-23 und 24-35, 37, 40-44 (teil.)

Verfahren zur Herstellung von Fetten/Ölen/Lipiden in transgenen Organismen enthaltend  
delta 6 desaturase und delta 6 elongase  
delta 5 desaturase und delta 5 elongase  
---

## 5. Ansprüche: 36, 45-48

Öl, Lipide, fettsäuren  
---

## 6. Anspruch: 37 (teil.)

Verwendung einer delta 12 elongase  
---

## 7. Anspruch: 37 (teil.)

Verwendung einer delta 6 desaturase  
---

## 8. Anspruch: 37 (teil.)

Verwendung einer delta 5 desaturase

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## 9. Anspruch: 37 (teil.)

Verwendung einer delta 6 elongase

## 10. Anspruch: 37 (teil.)

Verwendung einer delta 5 elongase

## 11. Anspruch: 40 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 38  
zusätzlich enthaltend eine delta 5 elongase

## 12. Anspruch: 40 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 39  
zusätzlich enthaltend eine delta 5 elongase

## 13. Anspruch: 41 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 38  
zusätzlich enthaltend ein fettsäure oder lippidstoffwechsel  
gen

## 14. Anspruch: 41 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 39  
zusätzlich enthaltend ein fettsäure oder lippidstoffwechsel  
gen

## 15. Anspruch: 41 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 40  
zusätzlich enthaltend ein fettsäure oder lippidstoffwechsel  
gen

## 16. Anspruch: 42 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 38  
zusätzlich enthaltend eine delta 4 desaturase

## 17. Anspruch: 42 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 39  
zusätzlich enthaltend eine delta 4 desaturase

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## 18. Anspruch: 42 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 40  
zusätzlich enthaltend eine delta 4 desaturase

## 19. Anspruch: 42 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 41  
zusätzlich enthaltend eine delta 4 desaturase

## 20. Anspruch: 42 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 38  
zusätzlich enthaltend eine delta 8 desaturase

## 21. Anspruch: 42 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 39  
zusätzlich enthaltend eine delta 8 desaturase

## 22. Anspruch: 42 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 40  
zusätzlich enthaltend eine delta 8 desaturase

## 23. Anspruch: 42 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 41  
zusätzlich enthaltend eine delta 8 desaturase

## 24. Anspruch: 42 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 38  
zusätzlich enthaltend eine delta 9 desaturase

## 25. Anspruch: 42 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 39  
zusätzlich enthaltend eine delta 9 desaturase

## 26. Anspruch: 42 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 40  
zusätzlich enthaltend eine delta 9 desaturase

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## 27. Anspruch: 42 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 41  
zusätzlich enthaltend eine delta 9 desaturase  
---

## 28. Anspruch: 42 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 38  
zusätzlich enthaltend eine delta 9 elongase  
---

## 29. Anspruch: 42 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 39  
zusätzlich enthaltend eine delta 9 elongase  
---

## 30. Anspruch: 42 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 40  
zusätzlich enthaltend eine delta 9 elongase  
---

## 31. Anspruch: 42 (teil.)

Rekombinanstes Nukleinsäuremolekül nach anspruch 41  
zusätzlich enthaltend eine delta 9 elongase  
---

## 32. Anspruch: 43 (teil.)

Transgene pflanze enthaltend ein Nukleinsäure molekül nach  
anspruch 38  
---

## 33. Anspruch: 43 (teil.)

Transgene pflanze enthaltend ein Nukleinsäure molekül nach  
anspruch 39  
---

## 34. Anspruch: 43 (teil.)

Transgene pflanze enthaltend ein Nukleinsäure molekül nach  
anspruch 40  
---

## 35. Anspruch: 43 (teil.)

Transgene pflanze enthaltend ein Nukleinsäure molekül nach  
anspruch 41  
---

## WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

## 36. Anspruch: 43 (teil.)

Transgene pflanze enthaltend ein Nukleinsäure molekül nach  
anspruch 42

---

## 37. Anspruch: 49 und 52 (teil.)

Isolierte Nukleinsäure mit delta 5 elongase aktivität (SEQ  
ID No 197).

---

## 38. Ansprüche: 50 und 52, 54 (teil.)

Isolierte Nukleinsäure mit delta 6 elongaseaktivität (SEQ ID  
No 199).

---

## 39. Ansprüche: 51 und 52, 54 (teil.)

Isolierte Nukleinsäure mit delta 6 desaturaseaktivität (SEQ  
ID No 201).

---

## 40. Anspruch: 55 (teil.)

Transgene pflanze enthaltend als transgen eine Nukleinsäure  
mit delta 5 elongase aktivität (SEQ ID No 197).

---

## 41. Anspruch: 55 (teil.)

Transgene pflanze enthaltend als transgen eine Nukleinsäure  
mit delta 6 elongase aktivität (SEQ ID No 199).

---

## 42. Anspruch: 55 (teil.)

Transgene pflanze enthaltend als transgen eine Nukleinsäure  
mit delta 6desaturaseaktivität (SEQ ID No 201).

---

WEITERE ANGABEN

PCT/ISA/ 210

Fortsetzung von Feld II.2

Ansprüche Nr.: 53

Der anspruch 53 ist nicht klar da er auf sich selbst bezieht.

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, dass Patentansprüche auf Erfindungen, für die kein internationaler Recherchenbericht erstellt wurde, normalerweise nicht Gegenstand einer internationalen vorläufigen Prüfung sein können (Regel 66.1(e) PCT). In seiner Eigenschaft als mit, der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde wird das EPA also in der Regel keine vorläufige Prüfung für Gegenstände durchführen, zu denen keine Recherche vorliegt. Dies gilt auch für den Fall, dass die Patentansprüche nach Erhalt des internationalen Recherchenberichtes geändert wurden (Art. 19 PCT), oder für den Fall, dass der Anmelder im Zuge des Verfahrens gemäss Kapitel II PCT neue Patentanprüche vorlegt. Nach Eintritt in die regionale Phase vor dem EPA kann jedoch im Zuge der Prüfung eine weitere Recherche durchgeführt werden (Vgl. EPA-Richtlinien C-VI, 8.5), sollten die Mängel behoben sein, die zu der Erklärung gemäss Art. 17 (2) PCT geführt haben.

**INTERNATIONAL RECHERCHENBERICHT**

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

**PCT/EP2005/001863**

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
DE 10219203	A1	13-11-2003	AU	2003232512 A1	17-11-2003
			CA	2485060 A1	13-11-2003
			WO	03093482 A2	13-11-2003
			EP	1501932 A2	02-02-2005
<hr/>					



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record.**

## **BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

☐ **BLACK BORDERS**

☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**

☐ **FADED TEXT OR DRAWING**

☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**

☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**

☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**

☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**

☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**

☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**

☐ **OTHER: \_\_\_\_\_**

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**

**This Page Blank (uspto)**